

Charakterisierung der zellulären Immunantwort nach
Infektion mit dem Woodchuck Hepatitis Virus (WHV)
in nordamerikanischen Waldmurmeltieren

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

doctor rerum naturalium

des Fachbereichs

Biologie und Geografie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Ina Schulte geb. Frank

aus Bad Friedrichshall

Juni 2007

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Virologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Roggendorf

2. Gutachter: PD Dr. R. Grümmer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: PD Dr. B. Siebers

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2007

I. Abkürzungsverzeichnis

α	anti
aa	amino acid (Aminosäure)
Abb.	Abbildung
ALT	Alaninaminotransferasen
APC	antigen-presenting cell (antigenpräsentierende Zelle)
APC-konjugiert	Allophycocyanin-konjugiert
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
cccDNA	kovalent geschlossene, zirkuläre Form der DNA (covalently closed circular DNA)
CD	cluster of differentiation (Differenzierungsantigen)
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CP	zytoplasmatisch
CpG	Cytidin-Phosphat-Guanosin-Dinukleotid
CTL	cytotoxic T lymphocyte (zytotoxischer T-Lymphozyt)
DC	dendritic cell (Dendritische Zelle)
DHBV	Duck Hepatitis Virus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISpot	enzyme-linked immunospot-assay
engl.	englisch
et al.	et alii bzw. et aliae (und andere)
FACS	fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometer)
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm; Erdbeschleunigung
HBcAg	Hepatitis B Virus core antigen
HBeAg	Hepatitis B Virus early antigen
HBsAg	Hepatitis B Virus surface antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HBxAg	Hepatitis B Virus x antigen
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	human leukocyte antigen
HRP	horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)

ICS	intracellular cytokine staining
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kD	kiloDalton
LAMP-1	lysosomal associated membrane glykoprotein 1
Mamo I	<i>Marmota monax</i> MHC Klasse I
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIP	macrophage inflammatory protein
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NT	nicht translatiert
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
OPD	o-Phenylendiamine
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
p.i.	post infectionem (nach Infektion)
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PerCP	Peridinin Chlorophyll a-Protein
pgRNA	prägenomische RNA
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RANTES	Abkürzung für: Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and presumably Secreted
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
RT	Reverse Transkriptase; real time
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCR	T cell receptor (T-Zellrezeptor)
TM	Transmembran-Domäne
TNF	Tumor-Nekrose-Factor
TP	terminales Protein
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit

v/v	Volumenprozent (volume per volume)
w/v	Massenprozent (weight per volume)
WHcAg	Woodchuck Hepatitis Virus core antigen
WHeAg	Woodchuck Hepatitis Virus early antigen
WHsAg	Woodchuck Hepatitis Virus surface antigen
WHV	Woodchuck Hepatitis Virus
WHxAg	Woodchuck Hepatitis Virus x antigen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- β -Galactosid

II. Zusammenfassung

Für Studien zur Pathogenese einer hepadnaviralen Infektion hat sich das mit dem Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) infizierte nordamerikanische Waldmurmeltier (*engl.* woodchuck) als Modellsystem etabliert. Während der akute, selbst-limitierende sowie der chronische Infektionsverlauf hinsichtlich der T-Helferzellantworten gegen virale Proteine in diesem Modell bereits gut charakterisiert ist, war der Nachweis von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) bislang nicht möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde die WHV-spezifische CTL-Antwort im Murmeltiermodell erstmals charakterisiert.

Im ersten Teil wurde die zelluläre Immunantwort gegen das virale Oberflächenprotein WHsAg nach DNA-Vakzinierung im gut charakterisierbaren Mausmodell dargestellt, um die generelle Anwendbarkeit der verwendeten Technik zu zeigen („*proof of principle*“). Zur Kartierung von T-Zell-Epitopen wurde ein Stimulationsprotokoll mit überlappenden Peptiden und anschließender durchflusszytometrischer Analyse der Zytokinproduktion etabliert. Dabei wurden zwei Peptide identifiziert, welche potentielle Epitope von CD4⁺ T-Zellen darstellten. Das Oberflächenprotein von WHV war folglich dazu in der Lage, zelluläre Immunantworten zu induzieren. Für CD8⁺ T-Lymphozyten wurde bisher kein WHsAg-spezifisches Epitop kartiert. Dennoch wurde gezeigt, dass das etablierte Stimulationsprotokoll für die Identifizierung von T-Zell-spezifischen Epitopen und damit für die Charakterisierung der zellulären Immunantwort geeignet ist.

Im Anschluss daran wurde eine Nachweismethode für WHV-spezifische CTL etabliert, welche auf der Detektion des degranulationsassoziierten Markers CD107a nach Peptidstimulation basierte. Aufgrund der starken Ähnlichkeit des Woodchuck-CD107a zu dem anderer Spezies wurde ein kreuzreaktiver, monoklonaler anti-CD107a-Antikörper identifiziert, mit dem die durchflusszytometrischen Analysen durchgeführt werden konnten. Nach der Etablierung der Methode an Splenozyten immuner Tiere und der Identifizierung eines kapsidspezifischen CTL-Epitopes (c96-110) wurde die Kinetik der virusspezifischen CTL-Antwort im Verlauf der akuten WHV-Infektion untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass eine starke CTL-Antwort gegen c96-110 induziert

wurde, welche mit der Eliminierung des Virus aus dem peripheren Blut korrelierte. Die Immunantwort gegen ein WHsAg-spezifisches Epitop (s220-234) war weniger stark ausgeprägt. Chronisch WHV-infizierte Murmeltieren zeigten keine nachweisbare CTL-Antwort gegen das WHcAg-Epitop c96-110. Die zytotoxische T-Zellantwort gegen das Kapsidantigen spielte folglich eine entscheidende Rolle für die Eliminierung des Virus.

Da das identifizierte Peptid c96-110 von der Mehrheit der akut oder post-akut WHV-infizierten Tiere erkannt wurde, war die Restriktion des Epitopes für ein bestimmtes MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse I-Allel zu vermuten. Eine Typisierung der *Mamo I* genannten MHC-Gene erbrachte jedoch keinen Hinweis auf ein immundominantes Allel.

Die Bedeutung der identifizierten CTL-Epitope für die Viruseliminierung wird in zukünftigen Studien durch gezielte Mutagenese der entsprechenden viralen Sequenzen untersucht werden.

III. Inhaltsverzeichnis

- I. Abkürzungsverzeichnis
- II. Zusammenfassung
- III. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	11
1.1 Hepadnaviridae.....	11
1.1.1 Morphologie.....	12
1.1.2 Genomorganisation	13
1.1.3 Replikationszyklus	15
1.2 Tiermodelle der hepadnaviralen Infektion	17
1.3 Pathogenese einer HBV-Infektion des Menschen	18
1.3.1 Klinischer Verlauf einer HBV-Infektion.....	18
1.3.2 Diagnostik der akuten und der chronischen HBV-Infektion.....	19
1.4 Immunpathogenese	21
1.4.1 Die adaptive Immunantwort	21
1.4.1.1 B-Lymphozyten.....	21
1.4.1.2 Erkennung virus-infizierter Zellen durch T-Lymphozyten.....	22
1.4.1.3 T-Helferzellen	24
1.4.1.4 Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL).....	25
1.4.1.5 Der Granula-abhängige Exozytoseweg	26
1.4.1.6 Das CD107a-Glykoprotein.....	27
1.4.2 Die zelluläre Immunantwort gegen Hepadnaviren	29
1.4.2.1 Die MHC II-restringierte T-Zellantwort (T-Helferzellen)	29
1.4.2.2 Die MHC I-restringierte T-Zellantwort (Zytotoxische T-Lymphozyten)	30
1.5 Zielsetzung	32
2. Material und Methoden.....	33
2.1 Materialien	33
2.1.1 Versuchstiere.....	33
2.1.2 Betäubungsmittel.....	33
2.1.3 Virusstämme.....	33
2.1.4 Bakterien	33
2.1.5 Chemikalien	34
2.1.6 Reagenzien für die Zellkultur	34
2.1.7 Peptide	35
2.1.8 Antikörper	35
2.1.9 Plasmide.....	37
2.1.10 Oligonukleotide	37
2.1.11 Puffer und Lösungen	38
2.1.12 Kommerzielle Standardtests.....	39
2.1.13 Reagenzien für die Molekularbiologie.....	39
2.1.14 Verbrauchsmaterialien.....	39
2.1.15 Geräte.....	40

2.2	Methoden.....	41
2.2.1	Versuchstiere.....	41
2.2.1.1	Narkotisierung	41
2.2.1.2	WHV-Infektion	41
2.2.1.3	DNA-Immunisierung	41
2.2.1.4	Blutentnahmen	42
2.2.1.5	Organentnahme.....	42
2.2.1.6	Wiederholte Milzteilentnahme bei Murmeltieren	42
2.2.2	Präparation von Zellen aus der Milz und aus mesenterialen Lymphknoten	43
2.2.3	Isolierung von Leukozyten aus peripherem Blut von Murmeltieren	43
2.2.4	Zellkulturtechniken.....	43
2.2.4.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen	43
2.2.4.2	Zellzahlbestimmung.....	44
2.2.5	<i>In vitro</i> -Stimulation mit WHV-Peptiden.....	44
2.2.6	Durchflusszytometrie	44
2.2.6.1	Intrazelluläre Zytokinfärbung (intracellular cytokine staining, ICS)	45
2.2.6.2	CD107a-Degranulationstest	46
2.2.6.3	Datenanalyse.....	47
2.2.7	Molekularbiologische Arbeiten.....	47
2.2.7.1	Isolation von Gesamt-RNA und cDNA-Synthese.....	47
2.2.7.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	47
2.2.7.3	Bestimmung des MHC Klasse I-Status.....	48
2.2.7.4	Klonierung der Woodchuck-CD107a-DNA-Sequenz	49
2.2.7.5	DNA-Gelelektrophorese	50
2.2.7.6	Gelextraktion und Klonierung	50
2.2.7.7	Bakterien-Kolonie-PCR	50
2.2.7.8	Isolation von Plasmid-DNA.....	51
2.2.7.9	Sequenzierungen	51
2.2.7.10	Quantitative PCR.....	51
2.2.7.11	Quantifizierung von WHV-DNA im Serum	51
2.2.8	Bestimmung WHV-spezifischer Antikörper (ELISA) im Maus- und im Woodchuckserum.....	52
3.	Ergebnisse.....	54
3.1	Intrazelluläre Zytokinfärbung (intracellular cytokine staining, ICS) muriner Milzzellen	54
3.2	Klonierung der Woodchuck-CD107a-DNA-Sequenz	61
3.3	Nachweis WHcAg-spezifischer T-Zellen in der Milz von Murmeltieren mit ausgeheilter WHV-Infektion.....	64
3.4	Analyse von Splenozyten naiver Murmeltiere unter Verwendung des CD107a-Degranulationstests	67
3.5	Nachweis WHcAg-spezifischer T-Zellen in Lymphknoten von Murmeltieren mit ausgeheilter WHV-Infektion.....	68
3.6	Kartierung eines WHcAg-Epitopes	69

3.7	Phänotypische Charakterisierung der WHcAg-spezifischen T-Lymphozyten	71
3.8	Charakterisierung der WHcAg-spezifischen T-Zellantwort in der akuten Phase einer WHV-Infektion.....	72
3.9	Charakterisierung der WHcAg-spezifischen T-Zellantwort in der chronischen Phase einer WHV-Infektion	76
3.10	Charakterisierung der WHsAg-spezifischen T-Zellantwort in der akuten Phase einer WHV-Infektion.....	77
3.11	Bestimmung des MHC Klasse I-Status der verwendeten Murmeltiere	79
4.	Diskussion.....	81
4.1	Charakterisierung von T-Zellepitopen des WHsAg in der Maus	81
4.2	Etablierung einer Nachweismethode für virusspezifische zytotoxische T-Lymphozyten im Woodchuck-Modell	83
4.2.1	Klonierung der Woodchuck-CD107a-DNA-Sequenz	84
4.2.2	Etablierung des CD107a-Degranulationstests.....	84
4.2.3	Kartierung von MHC I-restringierten Epitopen des WHcAg und des WHsAg.....	85
4.3	Kinetik der virusspezifischen CTL-vermittelten Immunantwort im Verlauf der akuten und der chronischen WHV-Infektion	88
4.4	Ausblick	89
5.	Literaturverzeichnis.....	90
6.	Anhang.....	101
6.1	Sequenzen.....	101
6.2	Abbildungsverzeichnis	116
6.3	Tabellenverzeichnis	117
6.4	Publikationsverzeichnis.....	118
6.5	Danksagung.....	119
6.6	Lebenslauf	120
6.7	Erklärungen zur Dissertation.....	121

1. Einleitung

1.1 Hepadnaviridae

Als Hepadnaviren wird eine Gruppe kleiner DNA-Viren bezeichnet, welche einen ausgeprägten Lebertropismus aufweisen (*hepatotrope DNA-Viren*). Zu den Gemeinsamkeiten dieser Viren gehört, dass sie eine Virushülle und ein zirkuläres, partiell doppelsträngiges Genom von etwa 3 bis 3,3 kb aufweisen. Kennzeichnend für alle bisher bekannten Hepadnaviren ist ihre enge Wirtsspezifität. Eine hepadnavirale Infektion kann sowohl mit einem akut-selbstlimitierenden als auch einem chronischen Krankheitsverlauf assoziiert sein. Bei den heute bekannten Hepadnaviren werden zwei Genera unterschieden: die Hepadnaviren der Säugetiere (Orthohepadnaviridae) und die der Vögel (Avihepadnaviridae). Es wurde gezeigt, dass der Verwandtschaftsgrad innerhalb dieser Gruppen jeweils größer ist als zwischen den Gruppen (Ganem et al., 2001). Tabelle 1.1 fasst die wichtigsten Vertreter der Hepadnaviridae zusammen.

Tab. 1.1: Hepadnaviren und ihre natürlichen Wirte

Genus		Natürlicher Wirt	Literatur
Hepatitis B Virus	HBV	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Dane et al., 1970
Woodchuck Hepatitis Virus	WHV	Amerikanisches Waldmurmeltier (Woodchuck; <i>Marmota monax</i>)	Summers et al., 1978
Arctic Squirrel Hepatitis Virus	ASHV	Arktisches Erdhörnchen (<i>Spermophilus parryi kennicotti</i>)	Testut et al., 1996
Ground Squirrel Hepatitis Virus	GSHV	Erdhörnchen (<i>Spermophilus beecheyi</i>)	Marion et al., 1980
Orang-Utan Hepatitis Virus	OHV	Borneo Orang-Utan (<i>Pongo pygmaeus</i>)	Warren et al., 1999
Woolly Monkey Hepatitis B Virus	WMHBV	Brauner Wollaffe (Woolly Monkey; <i>Lagothrix lagothricha</i>)	Lanford et al., 1998
Duck Hepatitis Virus	DHBV	Pekingente (<i>Anas domesticus</i>)	Mason et al., 1980
Heron Hepatitis B Virus	HHBV	Graureiher (<i>Adrea cinera</i>)	Sprengel et al., 1988

1.1.1 Morphologie

Die Virionen der Hepadnaviren bilden sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 40 bis 47nm. Sie bestehen aus einer Hülle, welche sich aus Lipiden der Wirtszelle und drei viral kodierte Proteinen zusammensetzt. Diese Oberflächenproteine werden als preS1- (langes S-Protein, L), preS2- (mittleres S-Protein, M) und S-Protein (*engl.* surface) bezeichnet und sind unterschiedlich glykosyliert. Das Nukleokapsid (core) hat einen Durchmesser von 22 bis 25nm und ist aus einem polymerisierten unglykosylierten Protein, dem core-Protein, aufgebaut. Im Inneren befinden sich die virale DNA sowie eine DNA-Polymerase mit Reverser Transkriptase-Aktivität (Robinson et al., 1974) (Abb. 1.1).

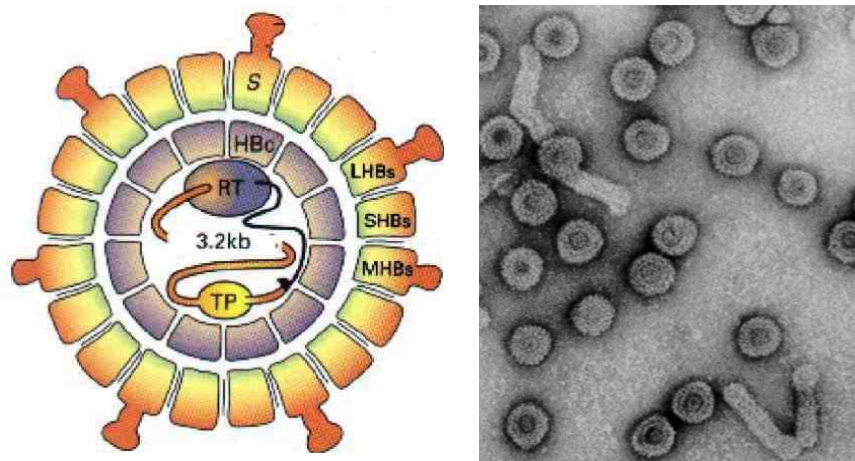


Abb. 1.1: Morphologie der Hepadnaviren. Die Abbildung links zeigt schematisch ein Virion (Dane-Partikel) mit den Oberflächenproteinen L-, M- und S-HBs sowie im Inneren das Kapsid aus core-Proteinen (HBc). Die virale Nukleinsäure ist mit einem terminalen Protein (TP) assoziiert. Die Polymerase weist eine Reverse Transkriptase (RT)-Aktivität auf. Rechts ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme von Virionen und HBsAg-Filamenten abgebildet (aus Doerr und Gerlich, Medizinische Virologie, Thieme Verlag).

Neben den vollständigen Virionen (nach ihrem Entdecker Dane-Partikel genannt) werden auch eine große Anzahl unvollständiger Viruspartikel in das Serum abgegeben (Dane et al., 1970) (Abb. 1.1). Diese subviralen Partikel werden bei der Virusreplikation im Vergleich zu den Dane-Partikeln im 10^4 - bis 10^6 -fachen Überschuss gebildet und liegen im Serum in sphärischer (16-25nm Durchmesser) oder tubulärer (100nm Länge) Form vor (Robinson et al., 1976). Neben dem S-Protein enthalten diese subviralen Partikel nur geringe Mengen des preS2-Proteins. Sie weisen weder ein Kapsid noch virale DNA auf und sind daher nicht infektiös.

1.1.2 Genomorganisation

Das Genom der Hepadnaviren besteht aus einer zirkulären, partiell doppelsträngigen DNA von 3,0 bis 3,3 kb Länge. Der DNA-Minusstrang hat eine konstante Länge und ist am 5'-Ende kovalent mit dem terminalen Protein (TP) verbunden. Dieses Protein stellt den aminoterminalen Bereich des Polymeraseproteins dar und dient als Primer für die Initiation der DNA-Synthese (Ganem et al., 1987). Die Länge des Plusstranges hingegen variiert stark und kann 50 bis 100% der Länge des Minusstranges umfassen (Tiollais et al., 1985; Howard et al., 1986). Die Zirkularisierung der DNA wird durch die Basenpaarung der 5'-Enden beider DNA-Stränge über eine Länge von etwa 200 Nukleotiden gewährleistet, ohne dass eine kovalente Bindung erfolgt (Tiollais et al., 1985). Der überlappende Bereich des Genoms wird von zwei jeweils elf Nukleotiden langen Sequenzen flankiert. Diese als *direct repeats* (DR1, DR2) bezeichneten Motive dienen als Startstelle für die Virusreplikation. Das sehr kleine Genom der Hepadnaviren ist auf eine kompakte Organisation der Gene angewiesen (Miller et al., 1989). Es verfügt daher über mehrere überlappende offene Leserahmen (*engl.* open reading frames, ORFs), welche das gesamte Genom umspannen. Etwa 50% der Nukleotide gehören zu mehr als einem Leserahmen. Durch die Nutzung unterschiedlicher Startcodons und ungespleißter Transkripte wird die Kodierungskapazität des Genoms effektiv ausgenutzt. Der Minusstrang der Orthohepadnaviren enthält vier offene Leserahmen, welche für sieben Genprodukte kodieren (Galibert et al., 1982).

- 1) Der Core/preCore (C/preC)-Leserahmen weist zwei Startcodons zur Translation des core-Proteins und des e-Antigens auf (Gerlich et al., 1980; Uy et al., 1986). Im Genom des WHV ist ein zusätzliches Startcodon in diesem Leserahmen zu finden (Galibert et al., 1982).
- 2) Der Leserahmen des S/preS-Gens kodiert mit drei Startcodons für die viralen Oberflächenproteine preS1 (L), preS2 (M) und S (Heermann et al., 1984; Neurath et al., 1985).
- 3) Das Polymerase (P)-Gen umfasst ca. 75% des Gesamtgenoms und überlappt daher mit den übrigen drei Leserahmen. Es kodiert für das DNA-bindende Protein, die Polymerase/Reverse Transkriptase und die RNase H (Bavand et al., 1989).

- 4) Der kleinste Leserahmen kodiert für das X-Protein (Galibert et al., 1982), welches die Signalwege in der Wirtszelle moduliert und direkt oder indirekt die Genexpression beeinflussen kann (Ganem et al., 2001).

Abbildung 1.2 zeigt schematisch die hepadnavirale Genomorganisation sowie die viralen Transkripte.

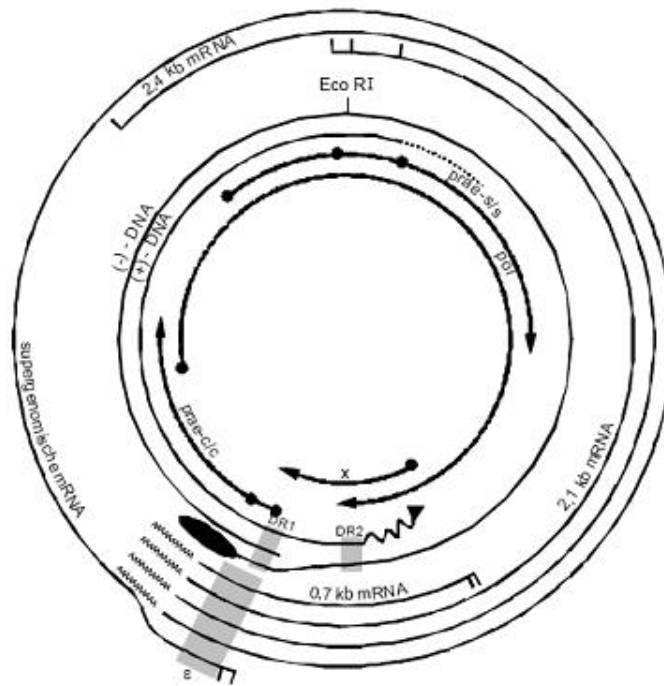


Abb. 1.2: Genomorganisation des Hepatitis B-Virus

Gezeigt sind (von innen nach außen) die viralen Transkripte, die Lage der vier offenen Leseraster (x, pol, prae-c/c und prae-s/s) und das Genom mit einigen strukturellen Details (ϵ : Epsilon-RNA-Verpackungssignal; DR1, DR2: *direct repeat* 1 und 2; Oligoribonukleotid am 5'-Ende des Plusstranges; Primase-Domäne der Polymerase am 5'-Ende des Minusstranges). Die ORFs sind durch Pfeile symbolisiert. Die Punkte geben die Translationsstartpunkte wider. Am 5'-Ende der vier mRNAs sind (soweit bekannt) die verschiedenen Transkriptionsstartpunkte angedeutet, an deren 3'-Ende befindet sich die Polyadenylierung. EcoRI: Schnittstelle für das Restriktionsenzym EcoRI; das erste Adenin in dessen Erkennungssequenz gilt als Startpunkt für die Nummerierung der Basen (Bauer, 2002).

1.1.3 Replikationszyklus

Der Verlauf der hepadnaviralen Replikation in einer Hepatozyte ist noch nicht vollständig untersucht. Insbesondere die ersten Schritte von der Anheftung des Virus (Adsorption) bis hin zum Transport des viralen DNA-Genoms in den Zellkern sind ungeklärt. Es wird vermutet, dass das hepadnavirale Virion an bislang unbekannte Oberflächenrezeptoren bindet und mittels Endozytose internalisiert wird (Abb. 1.3, Seite 16). Die Hülle des Virus wird vermutlich beim Durchtritt des Kapsids durch die endosomale Membran entfernt. Nach dem Transport des freigesetzten Core-Partikels zur Kernmembran wird die virale DNA durch die Kernporen ins Nukleoplasma transloziert.

Im Zellkern wird das virale Genom in die kovalent geschlossene zirkuläre DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) umgewandelt (Tuttleman et al., 1986). Diese dient als Vorlage für die Synthese genomischer und subgenomischer viraler messenger-RNAs (Will et al., 1987). Die Transkripte werden im Zytoplasma in die viralen Proteine (surface, early antigen/core, Polymerase und X-Protein) translatiert. Während der Assemblierung viraler Vorläuferkapside wird die genomische RNA verpackt (RNA packaging) und durch die RT-Aktivität der viralen Polymerase in DNA transkribiert (Pollack et al., 1994). Ein Teil der resultierenden Kapside wird zur Kernmembran transportiert (recycling). Durch die erneute Freisetzung der viralen Genome in den Kern wird der Pool an nukleärer cccDNA vergrößert (Tuttleman et al., 1986). Die Umhüllung vollständiger Kapside erfolgt an intrazellulären Membranen wie dem Endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi-Apparat. Anschließend werden die gereiften Virionen über einen bislang nicht bekannten Mechanismus an die Zelloberfläche transportiert und dort freigesetzt.

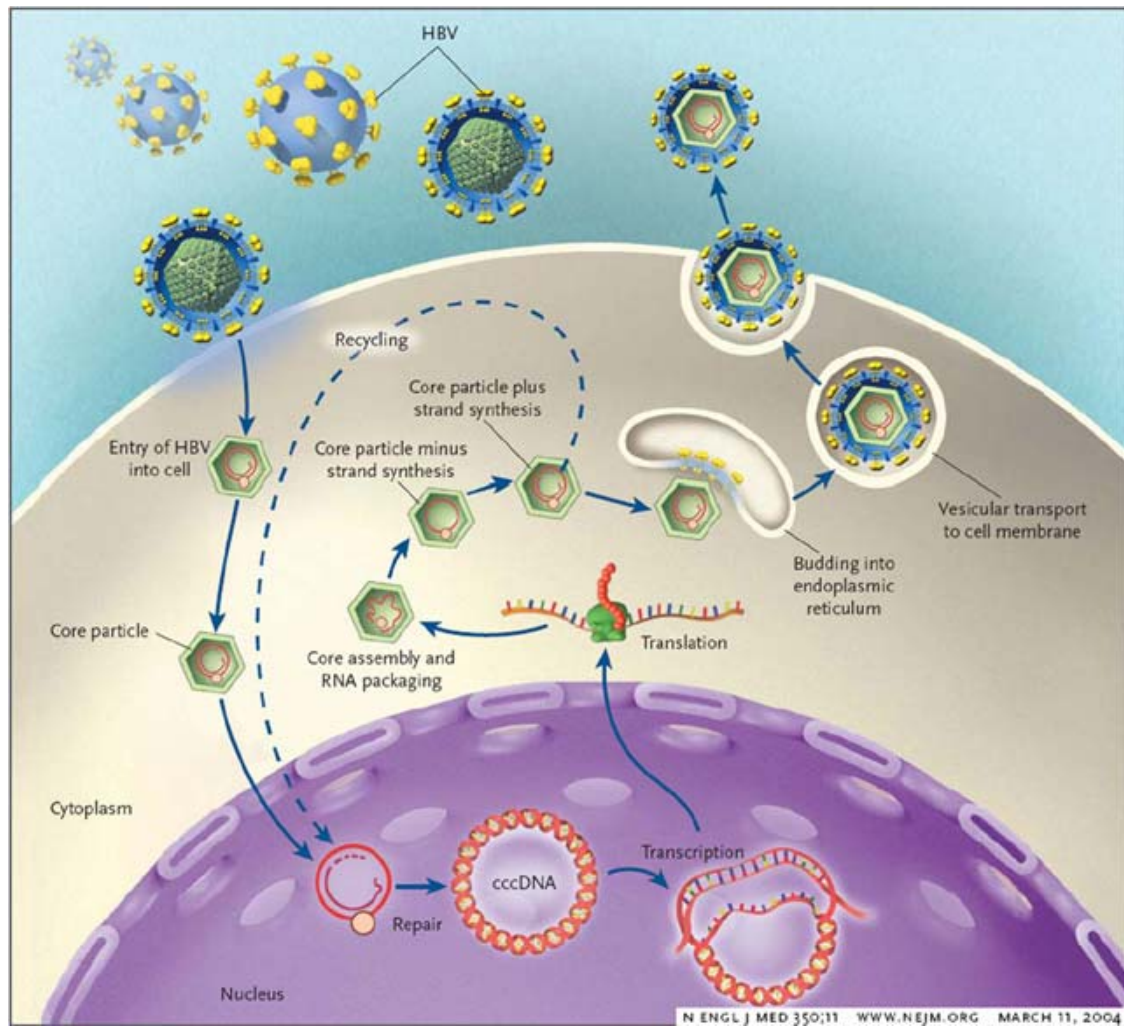


Abb. 1.3: Der Replikationszyklus des Hepatitis B-Virus
(aus Ganem et al., 2004)

1.2 Tiermodelle der hepadnaviralen Infektion

Zur Untersuchung der Pathogenese der hepadnaviralen Infektion wurde eine Reihe von Modellsystemen etabliert.

Mit DHBV infizierte Pekingenten werden seit langem für die Erforschung der Replikationsstrategien des Virus genutzt. Für die Erprobung antiviraler Therapien und neuer Impfstoffe hat dieses Tiermodell sich ebenfalls bewährt (Jilbert, 2005).

Schimpansen sind ideal für die Analyse der immunologischen Vorgänge in der Frühphase einer akuten Infektion, da sie neben dem Menschen die einzige natürlich mit HBV infizierbare Spezies sind (Barker et al., 1975). In diesem Modell durchgeführte Depletionsexperimente zeigten die Rolle der T-Zellantwort für den Verlauf einer akuten Infektion (Thimme et al., 2003).

Die experimentelle Infektion von nordamerikanischen Murmeltieren (*engl.* woodchuck, *lat.* Marmota monax) mit dem Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) ist am besten als Modell für die hepadnavirale Infektion des Menschen geeignet. Dies lässt sich mit der starken Ähnlichkeit von WHV zu HBV erklären. Die Homologie auf Nukleotidebene zwischen WHV und HBV liegt bei 70%. Im Gegensatz dazu besteht zwischen HBV und DHBV lediglich eine Sequenzhomologie von 40% (Tiollais et al., 1985). Die Pathogenese einer WHV-Infektion ist der einer humanen HBV-Infektion vergleichbar. Die Krankheitsverläufe reichen von einer subklinischen oder akuten bis hin zu einer chronischen Infektion mit der Entwicklung eines Hepatozellulären Karzinoms (HCC). Das Risiko einer Chronifizierung ist im Vergleich zur HBV-Infektion ebenfalls altersabhängig. Der Chronifizierungsgrad beträgt bei infizierten Neugeborenen etwa 90-95%, während lediglich 5-10% der infizierten erwachsenen Tiere eine chronische Hepatitis entwickeln.

Im Woodchuck-Modell wurden bereits einige Aspekte einer Infektion mit Hepadnaviren studiert, u.a. die Immunpathogenese (Menne et al., 1997; Menne et al., 1998; Wang et al., 2004) und Faktoren für die Entwicklung der chronischen Infektion oder von HCC (Miller et al., 1990; Cote et al., 2000; Wang et al., 2003). Auch das Auftreten und die Bedeutung viraler Mutanten in der

akuten und chronischen Infektion wurden bereits analysiert (Chen et al., 1992; Li et al., 1996; Botta et al., 2000). Lebertransplantationsstudien erlaubten die Untersuchung des adoptiven Immuntransfers im Woodchuck-Modell (Dahmen et al., 2004).

Aus klinischer Sicht wurde das Tiermodell verwendet, um Impfstoffe zum Schutz vor einer Infektion zu entwickeln (Lu et al., 1999; Garcia-Navarro et al., 2001). Auch antivirale Therapieformen mit neuen Nukleosidanaloga (Cullen et al., 1997 und 2001), Nicht-Nukleosidanaloga (Block et al., 1998; Donello et al., 1998) oder therapeutischer Vakzinierung (Hervas-Stubbs et al., 2001; Lu et al., 2001) wurden im Woodchuck-Modell getestet.

Für Studien zum natürlichen Verlauf einer hepadnaviralen Infektion ist das allgemein gebräuchliche Mausmodell nicht verwendbar, da ein murines Hepadnavirus unbekannt ist. Deshalb wurden HBV-transgene Mausmodelle entwickelt, welche wesentlich zum Verständnis der Immunbiologie und Pathogenese von HBV beigetragen haben (Chisari et al., 1985; Guidotti et al., 1995). Im Kapitel „Immunpathogenese“ werden die Besonderheiten dieses Tiermodells detaillierter beschrieben.

1.3 Pathogenese einer HBV-Infektion des Menschen

1.3.1 Klinischer Verlauf der HBV-Infektion

Eine Infektion mit HBV erfolgt hauptsächlich über den Austausch von infektiösen Körperflüssigkeiten (Blut, Sexualkontakt) und findet entweder zwischen Erwachsenen oder von der infizierten Mutter auf das Neugeborene statt (Ganem et al., 1982). Je nach Alter und Immunstatus des Infizierten führt die Infektion zu einer akuten selbst-limitierenden oder einer chronisch persistierenden Hepatitis.

Die akute Infektion verläuft bei gesunden Erwachsenen in ca. 65% der Fälle asymptomatisch. Bei ca. 20-30% der Patienten treten jedoch vielfältige Krankheitssymptome auf. Milde bis schwere Krankheitsverläufe mit Ikterus, Fieber, Übelkeit und abdominalen Schmerzen bis hin zur fulminanten Hepatitis mit akutem Leberversagen werden beschrieben. Während bei 90-95% der Patienten die Infektion nach etwa drei bis vier Monaten vollständig ausgeheilt

ist, wird in etwa 5-10% der Fälle ein chronischer Krankheitsverlauf beobachtet. Chronisch infizierte Patienten tragen ein hundertfach höheres Risiko, an Leberzirrhose oder einem Hepatozellulären Karzinom (HCC) zu erkranken als nicht-persistent Infizierte (Beasley et al., 1981). Die Onkogenität der Hepadnaviren wurde in Tiermodellen für weitere Orthohepadnaviren gezeigt (Marion et al., 1986; Popper et al., 1981; Seeger et al., 1991; Transy et al., 1992). Der genaue molekulare Mechanismus der Onkogenese ist für HBV unbekannt. Für WHV hingegen wurde gezeigt, dass eine Integration der viralen DNA ins Wirtsgenom die Aktivierung des Protoonkogens N-myc2 zur Folge hat (Fourel et al., 1990; Wei et al., 1992).

1.3.2 Diagnostik der akuten und der chronischen HBV-Infektion

Zur Diagnostik der akuten und chronischen HBV-Infektion wird eine Reihe serologischer Marker bestimmt (Abb. 1.4, Seite 20).

In den meisten Fällen ist das HBsAg der erste nachweisbare serologische Marker (ca. 6 Wochen nach Exposition). Es ist vor, während und noch einige Zeit nach der klinischen Krankheitsphase im Serum vorhanden. Bei chronischen Infektionen persistiert HBsAg. Es ist somit in der Inkubationszeit, in der Akutphase und bei einer chronischen Infektion nachweisbar.

Der direkte Nachweis von HBV-DNA im Serum mittels quantitativer PCR ist ein Marker für die Höhe der Virämie und damit ein Maß für die Infektiosität. Ferner wird die virale DNA zur Abschätzung des Therapieerfolges und der Elimination des Virus bestimmt. HBV-DNA kann bei Patienten mit akuter und chronischer Infektion nachgewiesen werden.

Der Nachweis von HBeAg ist als ein Hinweis auf eine aktive Virusvermehrung mit hoher Virämie zu werten. Die Bedeutung der HBeAg-Bestimmung für die Diagnostik tritt eher in den Hintergrund, da eine zunehmende Zahl von Patienten mit chronischer replikativer Hepatitis B (HBV-DNA positiv) HBeAg-negativ und Anti-HBe-positiv sind. Bei diesen Patienten werden Virusmutanten im Bereich des Core-Gens repliziert (z.B. HBV-Präcore- oder Core-Promoter-Mutanten).

Mit Beginn der akuten Hepatitis-B-Symptomatik ist Anti-HBc nachweisbar, wobei die IgM- und IgG-Antikörperanteile je nach Schweregrad verschieden hohe Titer erreichen. Mit Abklingen der Symptome verschwindet Anti-HBc-IgM

im Verlauf von Monaten, während Anti-HBc-IgG jahrelang, oft lebenslang, persistiert. Bei Entwicklung einer chronischen Hepatitis B kann Anti-HBc-IgM in mäßig hohen Konzentrationen nachweisbar bleiben, Anti-HBc-IgG bleibt immer hoch positiv. Bei Ausheilung verschwindet erst HBeAg, dann HBsAg und es erscheinen mit einigen Wochen Verzögerung die entsprechenden Antikörper anti-HBe und anti-HBs. Anti-HBs-Antikörper sind virusneutralisierend und vermitteln damit eine protektive Immunität gegen Reinfektion.

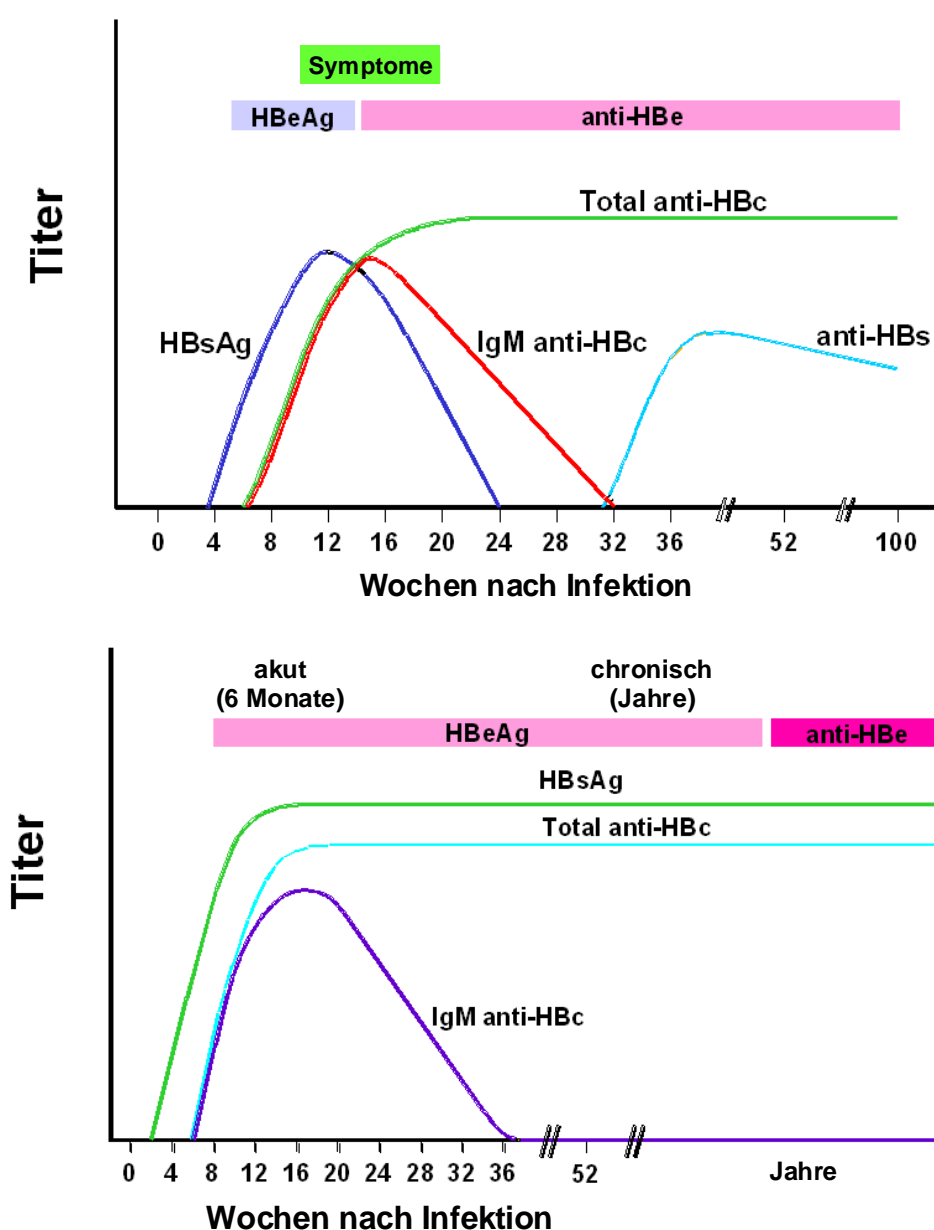


Abb. 1.4: Schematischer Verlauf einer Hepatitis B-Infektion. Die Graphik zeigt den serologischen Verlauf einer akuten (oben) und einer chronischen (unten) HBV-Infektion anhand der viralen Proteine HBsAg und HBeAg sowie der spezifischen Antikörper anti-HBs, anti-HBc (IgM) und anti-HBe.

1.4 Immunpathogenese

1.4.1 Die adaptive Immunantwort

Bei Säugetieren gibt es mit der angeborenen und der erworbenen Immunantwort zwei unterschiedliche Abwehrsysteme gegen eine virale Infektion.

Die angeborene Immunantwort reagiert innerhalb kürzester Zeit nach Eintritt des Pathogens und vermittelt einen nicht erregerspezifischen Schutz gegen die Infektion.

Die erworbene spezifische Immunität wird durch die Zellpopulation der Lymphozyten vermittelt. Diese antigenspezifischen Zellen üben verschiedene Effektorfunktionen gegen virusinfizierte Zellen aus und sind maßgeblich an der Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses beteiligt. Lymphozyten entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen und befinden sich in großer Anzahl im Blut, in der Lymphe sowie in lymphoiden Geweben. Sie werden nach dem Ort ihrer Reifung in B- und T-Lymphozyten unterschieden. Die B-Zellen entwickeln sich direkt aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks (*engl. bone marrow*), während die T-Zellen vom Knochenmark in den Thymus wandern und dort ausreifen.

1.4.1.1 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten sind für die humorale Immunität verantwortlich, welche durch Antikörper vermittelt wird.

Die Moleküle für die Erkennung von Antigenen sind bei B-Zellen die Immunglobuline (Ig). Diese werden als membrangebundene Rezeptoren (B-Zellrezeptor) sowie als sezernierte Antikörper produziert.

Die Aufnahme eines löslichen Antigens in die B-Zelle erfolgt nach Bindung an den B-Zellrezeptor durch Internalisierung des Antigen-Antikörperkomplexes. Nach der intrazellulären Prozessierung werden Peptide des Antigens auf der B-Zelloberfläche präsentiert und dadurch T-Helferzellen aktiviert. Infolge der Stimulation durch die Antigen-Bindung und durch die T-Helferzellen proliferiert die B-Zelle und differenziert zu einer Plasmazelle, welche spezifische Antikörper sezerniert. Diese Antikörper schützen vor einer Infektion, indem sie

unter anderem die toxischen Effekte oder die Infektiosität eines Pathogens durch Bindung inhibieren (Neutralisation).

1.4.1.2 Erkennung virus-infizierter Zellen durch T-Lymphozyten

Die Funktion der T-Lymphozyten ist die Eliminierung von Pathogenen wie Viren und Bakterien. Voraussetzung dafür ist die direkte Interaktion der T-Zellen mit infizierten oder Antigen-präsentierenden Zellen. Die Erkennung erfolgt durch die Wechselwirkung des T-Zellrezeptors (TCR) und verschiedener Ko-Rezeptoren mit Oberflächenmolekülen der Zielzelle, mittels derer Antigenfragmente des Pathogens präsentiert werden. Diese Oberflächenproteine sind dem Haupthistokompatibilitätskomplex (*engl. major histocompatibility complex*, MHC) zuzuordnen.

Der Haupthistokompatibilitätskomplex besteht aus einer Gruppe von Genen, die für viele an der Antigenpräsentation beteiligte Proteine kodieren. Vorrangig sind dabei die MHC-Glykoproteine der Klasse I und Klasse II zu nennen. Die Besonderheiten der MHC-Genloci liegen in ihrer Polygenie und ihrem Polymorphismus. Durch das Vorhandensein mehrerer verschiedener Gene exprimiert ein Individuum mindestens je drei verschiedene antigenpräsentierende MHC Klasse I- und Klasse II-Moleküle auf der Zelloberfläche. Von jedem dieser Gene gibt es sehr viele Varianten innerhalb der gesamten Population. MHC-Gene sind die Gene mit dem höchsten bekannten Polymorphismus (Robinson et al., 2000; Ruiz et al., 2000).

Dieser Polymorphismus ist von entscheidender Bedeutung bei der Antigenerkennung durch T-Lymphozyten. Eine T-Zelle erkennt ein Antigen als Peptid, das von einer bestimmten allelischen Variante eines MHC-Moleküls präsentiert wird. Im Kontext eines anderen MHC-Moleküls wird das gleiche Peptid hingegen nicht erkannt. Diese Eigenschaft der T-Zellen wird MHC-Restriktion genannt.

MHC-Moleküle präsentieren Peptide aus zwei unterschiedlichen intrazellulären Kompartimenten an der Zelloberfläche. Antigenfragmente, welche an MHC Klasse I-Proteine binden, stammen in der Regel von Erregern, die sich intrazellulär vermehren, wie z.B. Viren und unterliegen daher einer zytosolischen Prozessierung. Dagegen sind Antigenfragmente, die von MHC Klasse II-Molekülen präsentiert werden, auf extrazelluläre Pathogene und

Proteine zurückzuführen, die in Endosomen internalisiert und dort degradiert wurden.

Die Verteilung von MHC-Molekülen auf Zielzellen ist aufgrund der Effektorfunktionen der korrespondierenden T-Zellen unterschiedlich. MHC Klasse I-Proteine werden auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert und von zytotoxischen T-Lymphozyten (*engl.* cytotoxic T lymphocytes, CTL) erkannt. MHC Klasse II-Moleküle, welche von T-Helferzellen erkannt werden, sind auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie B-Lymphozyten, Dendritischen Zellen und Makrophagen zu finden.

Ein weiterer Unterschied zwischen den MHC-Klassen besteht in der Länge der präsentierten Peptide. Klasse I-gebundene Peptide weisen in der Regel eine Länge von acht bis zehn Aminosäuren auf. Die Länge von Peptiden, die an Klasse II-Moleküle binden, variiert stark und beträgt mindestens 13 Aminosäuren.

Ein MHC Klasse I-Protein ist ein Heterodimer aus einer transmembranen α -Untereinheit (MW 43 kDa) und dem nicht-kovalent gebundenen β_2 -Mikroglobulin (12 kDa). Die α -Untereinheit besteht aus den drei Domänen α_1 , α_2 und α_3 . Durch Faltung der α_1 - und α_2 -Domäne entsteht eine Furche, in der das Peptidantigen an das MHC-Molekül gebunden wird (Abb. 1.5, Seite 24). Die Struktur eines MHC Klasse II-Proteins ähnelt der eines Klasse I-Moleküls. Klasse II-Proteine bestehen jedoch aus zwei transmembranen Glykoproteinuntereinheiten, der α -Untereinheit (34 kDa) und der β -Untereinheit (29 kDa). Die Peptid-bindende Furche wird hier durch die α_1 - und die β_1 -Domäne gebildet (Abb. 1.5).

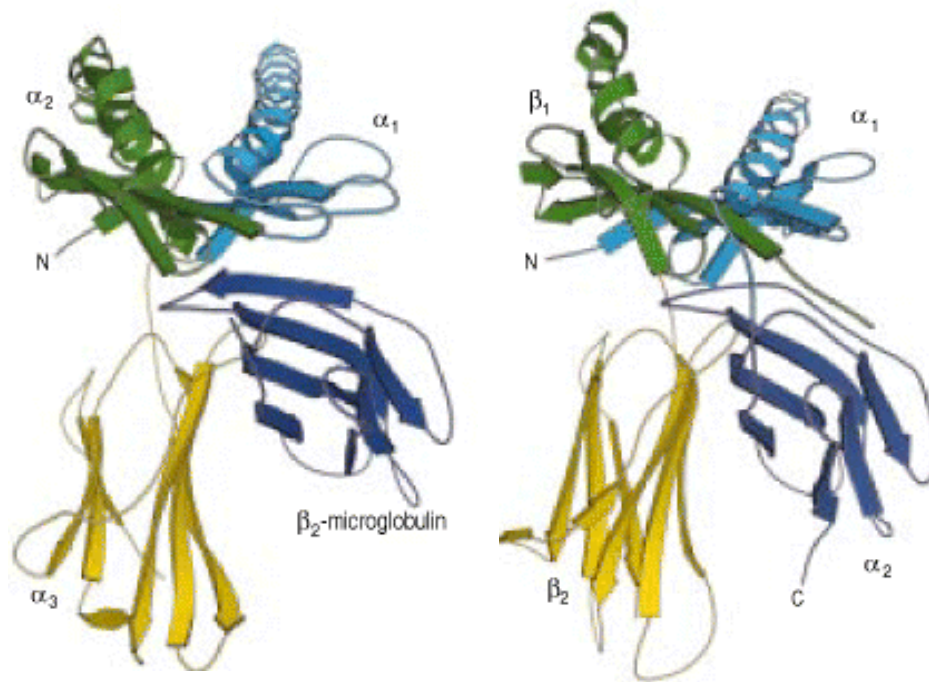


Abb. 1.5: Die Strukturen eines MHC Klasse I- und eines MHC Klasse II-Moleküls. links: MHC Klasse I mit der α -Untereinheit, bestehend aus den Domänen α_1 , α_2 und α_3 , sowie der β_2 -Mikroglobulin-Untereinheit. rechts: MHC Klasse II mit den aus jeweils zwei Domänen bestehenden Untereinheiten α und β (modifiziert nach Janeway „Immunobiology“ 5. Auflage).

1.4.1.3 T-Helferzellen

T-Helferzellen sind durch die Expression des Glykoproteins CD4 charakterisiert, welches als Ko-Rezeptor bei der Antigenerkennung fungiert.

Aktivierte CD4⁺ T-Lymphozyten üben drei verschiedene Funktionen aus: Sie aktivieren B-Zellen, unterstützen CD8⁺ T-Zellen in ihrer Funktion und sezernieren zudem verschiedene Zytokine, welche wichtige immunmodulatorische Eigenschaften zeigen.

Die antigenspezifische Immunantwort der T-Helferzellen wird in zwei Typen, Typ 1 (T_H1) und Typ 2 (T_H2), eingeteilt. Diese T_H -Zell-Typen unterscheiden sich voneinander in ihrer Effektorfunktion und der Sekretion von Zytokinen (Mosmann et al., 1989; Seder et al., 1994).

T_H1 -Zellen sezernieren Zytokine wie Interferon (IFN) γ , Interleukin (IL-) 2 und Lymphotoxin. IFN γ aktiviert vor allem Makrophagen und verstärkt bei B-Zellen den Immunglobulin-Klassenwechsel (Immunglobulin-Switch) von IgM zu IgG_{2a}, ein Kennzeichen einer T_H1 -Immunität (Finkelman et al., 1990).

T_H2 -Zellen produzieren IL-4, -5, -10 und -13 und sind auf die Aktivierung von B-Zellen spezialisiert. Kennzeichen einer T_H2 -assoziierten Immunantwort ist die

hohe Konzentration an IL-4 und der Immunglobulin-Switch zu IgG₁ (Stevens et al., 1988).

Eine T_H1-dominierte Immunantwort wird vor allem bei einer Infektion mit Viren oder intrazellulären Bakterien beobachtet. Auch durch DNA-Vakzinierung wird vorzugsweise eine T_H1-Antwort induziert (Li et al., 1998). Bei einer parasitären oder extrazellulären bakteriellen Infektion ist eine T_H2-Immunantwort dominant.

1.4.1.4 Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL)

Zytotoxische T-Zellen exprimieren auf der Zelloberfläche den Ko-Rezeptor CD8. Eine wichtige Aufgabe aktivierter CD8⁺ T-Lymphozyten besteht in der Erkennung und Eliminierung virusinfizierter Zellen, welche an ihrer Oberfläche virale Peptide mittels MHC I-Proteinen präsentieren.

Neben ihrer zytotoxischen Funktion haben CD8⁺ T-Zellen durch die Freisetzung verschiedener Zytokine und Chemokine auch einen regulativen Charakter. Zytotoxische T-Zellen exprimieren IFN γ , in geringerem Umfang auch den Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) α sowie eine Reihe so genannter Chemokine wie Makrophagen Inhibierendes Protein (MIP)-1 α , MIP-1 β oder RANTES (Wagner et al. 1998; Price et al., 1999). Über einen indirekten Mechanismus kann IFN γ die Vermehrung von Pathogenen inhibieren, indem es die Expression von MHC I stimuliert (Fruh et al., 1999), Makrophagen aktiviert (Portnoy et al., 1989) oder die Replikation des Pathogens wie z.B. HBV inhibiert (Gregory et al., 1993; Guidotti et al., 1994).

Darüber hinaus verfügen CTL mit einem Granula-abhängigen (Perforin/Granzyme) und einem Granula-unabhängigen (Ligand-induziert, z.B. FasL/Fas) Weg über zwei eigenständige zytolytische Mechanismen. Beide Wege führen zur Apoptose der Zielzelle. Charakteristisch für diesen programmierten Zelltod ist die Degradierung der chromosomalen DNA in ca. 200 bp lange Fragmente durch endogene Nukleasen. Durch die Aktivierung einer Reihe von Proteasen wird zudem die intrazelluläre Degradation initiiert. Die verbleibenden Zellreste, so genannte *apoptotic bodies*, werden von benachbarten phagozytierenden Zellen aufgenommen und rufen daher in der Regel keine Immunreaktion hervor. Mit diesem Mechanismus werden in einem immunkompetenten Organismus infizierte Zellen eliminiert (Hahn et al., 1995).

1.4.1.5 Der Granula-abhängige Exozytoseweg

Der Granula-Exozytoseweg ist durch die Sekretion zytotoxischer Granula von CTL oder NK-Zellen gekennzeichnet (Millard et al., 1984; Podack et al., 1984). Nach TCR-Stimulation werden die zytotoxischen Lysosomen zielgerichtet zu der Kontaktstelle zwischen CTL und Zielzelle transportiert (Henkart, 1994; Griffiths, 1995). Dort fusionieren sie mit der Zellmembran der CTL, der Inhalt wird in den interzellulären Spalt freigesetzt und induziert in der Zielzelle Apoptose (Abb. 1.6, Seite 27). Dieser als Degranulation bekannte Prozess ist Voraussetzung für die durch Granula vermittelte Effektorfunktion antigenspezifischer CTL.

Die lytischen Granula liegen im Zytoplasma von aktivierten zytotoxischen T-Zellen vorgeformt vor und enthalten verschiedene zytotoxische Proteine (Abb. 1.6). Dazu gehören unter anderem Serinproteasen (*Granzyme*, Gzm), lytische Moleküle (Perforin), verschiedene Rezeptoren (Mannose-6-Phosphat-Rezeptor) und Zytokine (TNF α). Der Inhalt ist von einer Lipiddoppelschicht umgeben, welche Lysosomen-assoziierte Membranproteine (*engl. lysosomal associated membrane glykoproteins*, LAMPs) enthält. Zu diesen Glykoproteinen zählen CD107a (LAMP-1), CD107b (LAMP-2) und CD63 (LAMP-3). Durch die Degranulation werden die Effektorproteine in die immunologische Synapse freigesetzt und der programmierte Zelltod der Zielzelle eingeleitet. Gleichzeitig gelangen die integralen Membranproteine der Granula durch Membranfusion auf die Oberfläche der zytotoxischen T-Zelle (Peters et al., 1991).

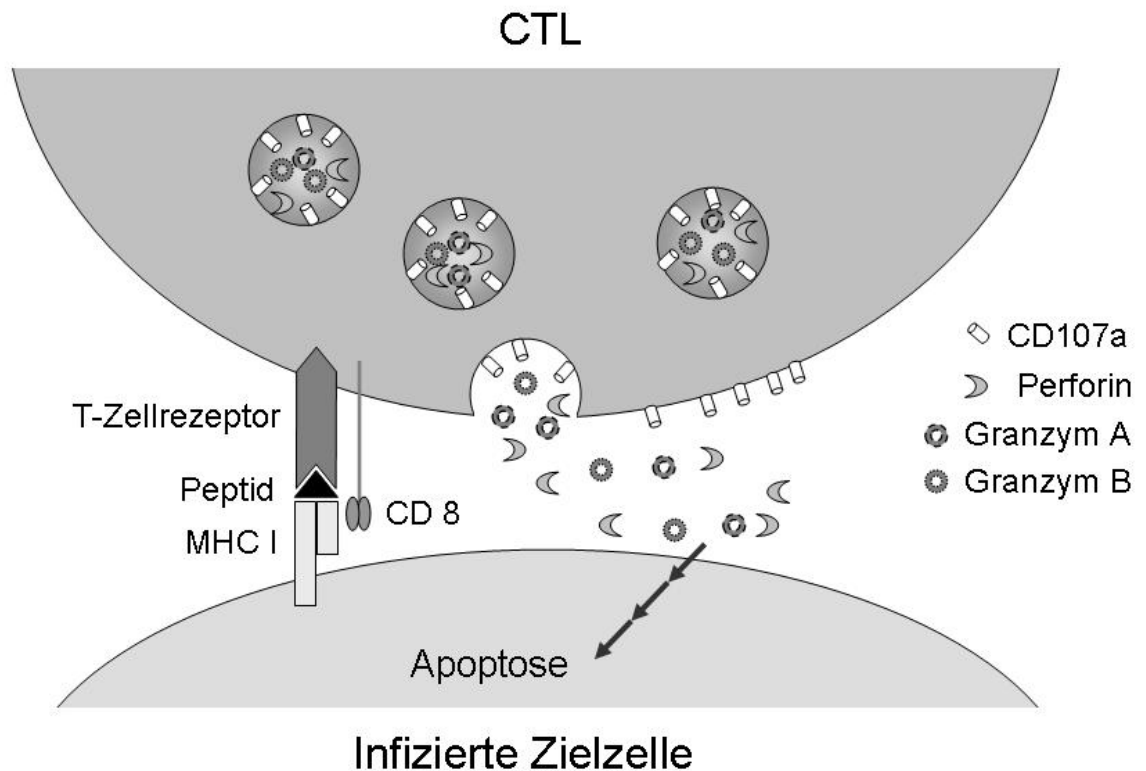


Abb. 1.6: Der Granula-abhängige zytolytische Mechanismus von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL). Lytische Speichergranula im Zytoplasma von Effektorzellen enthalten Perforin und Granzyme sowie membranständige Proteine, wie z.B. CD107a. Nach Erkennung einer infizierten Zielzelle über den T-Zellrezeptor-Komplex wird der Inhalt der lytischen Granula zur Apoptoseinduktion in den interzellulären Spalt (immunologische Synapse) freigesetzt.

1.4.1.6 Das CD107a-Glykoprotein

Neben dem Vorkommen auf aktivierten CTL wurde die Expression des Glykoproteins CD107a auch für andere Zelltypen beschrieben. Der Nachweis von CD107a auf der Oberfläche von Thrombozyten wurde dabei ebenfalls mit dem Aktivierungszustand der Zelle assoziiert (Febbraio et al., 1990). Die biologische Funktion des intrazellulär lokalisierten CD107a ist noch unbekannt. Ob dieses Glykoprotein zum Schutz der lysosomalen Membran vor der Degradation durch Hydrolasen beiträgt, wird kontrovers diskutiert (Fukuda et al., 1991; Kundra et al., 1999). Aufgrund seines Nutzens als biochemischer und immunologischer Marker für Lysosomen ist CD107a daher gut charakterisiert. Das für CD107a kodierende Gen wurde auf Chromosom 13 des Menschen (Mattei et al., 1990) bzw. Chromosom 8 der Maus (Bermingham et al., 1996) lokalisiert. Die entsprechende mRNA weist eine Länge von 2560 bp bzw. 2265 bp auf (GenBank-Zugangsnummer NM_005561 bzw. NM_010684). Das

translatierte Polypeptid weist ein Molekulargewicht von etwa 40 kDa auf. Kennzeichnend für die Tertiärstruktur (Abb. 1.7) sind zwei durch jeweils zwei Disulfidbrücken gebildete Domänen, welche durch eine Prolin- und Serin-reiche Region (*engl.* hinge region) verbunden sind (Carlsson et al., 1989). Im luminal gelegenen Hauptteil des Proteins wurden bis zu 18 Bindungsstellen für komplexe N-Glykane und sechs für O-Glykane identifiziert. Die Glykosylierung macht 55-65% der Masse des Membranproteins aus, so dass ein Molekulargewicht von 100-120 kDa resultiert (Fukuda et al., 1991).

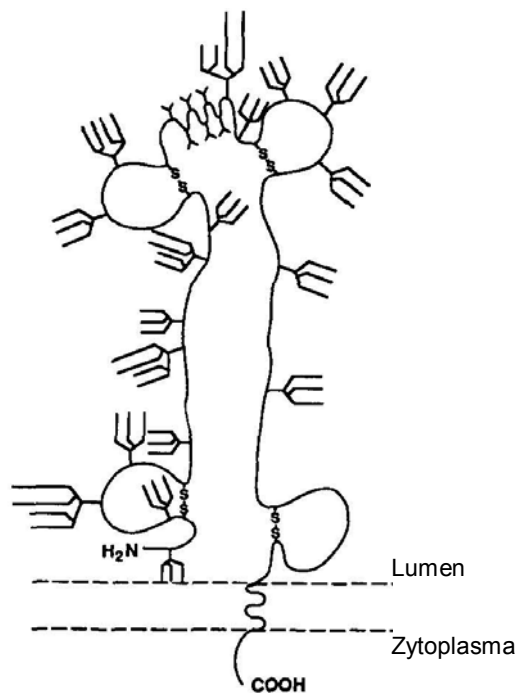


Abb. 1.7: Struktur des CD107a-Proteins. Der Hauptteil des Membranproteins ist auf der luminalen Seite lokalisiert. Die komplexen N- und O-Glykosylierungen sind als Aststrukturen dargestellt. Vier Domänen werden durch Disulfidbrücken gebildet. (Modifiziert nach Fukuda et al., 1991)

Das Membranprotein wurde neben Mensch und Maus für eine Reihe weiterer Spezies charakterisiert. So sind Sequenzdaten für CD107a von z.B. der Ratte (Himeno et al., 1989), dem Chinesischen Hamster (Uthayakumar et al., 1995), dem Rind (Hieber et al., 1993) oder dem Haushuhn (Fambrough et al., 1988) verfügbar.

1.4.2 Die zelluläre Immunantwort gegen Hepadnaviren

In der Pathogenese einer hepadnaviralen Infektion ist die zelluläre Immunantwort von zentraler Bedeutung.

HBV ist während der Replikation und bei der Freisetzung für infizierte Hepatozyten nicht direkt zytotoxisch. In HBV-transgenen Mausmodellen wurde gezeigt, dass die Genprodukte von HBV sowie die eigentliche Virusreplikation nicht direkt zytopathisch für die Hepatozyten waren (Araki et al., 1989; Farza et al., 1988). Chronische Virusträger wiesen trotz einer hohen Replikation des Virus in Hepatozyten einen asymptomatischen Krankheitsverlauf mit minimalen Leberschäden auf (de Franchis et al., 1993). Als Ursache für die hepatozelluläre Schädigung wird die zelluläre Immunantwort des Wirtes gegen virale Antigene, welche auf infizierten Hepatozyten präsentiert werden, angesehen (Chisari et al., 1997).

Die zelluläre Immunantwort gegen HBV wird auch mit der vollständigen Eliminierung bzw. der Persistenz des Virus assoziiert. Sowohl die MHC II- als auch die MHC I-restringierte T-Zellantwort spielen dabei eine Rolle.

1.4.2.1 Die MHC II-restringierte T-Zellantwort (T-Helferzellen)

Für eine akute, selbstlimitierende HBV-Infektion ist eine starke und multispezifische MHC II-restringierte Immunantwort gegen virale Antigene kennzeichnend. Die T-Zellantwort richtet sich dabei vorwiegend gegen die Kapsidproteine (HBcAg und HBeAg). Die gegen HBsAg gerichtete T-Helferzellantwort ist deutlich schwächer ausgeprägt (Ferrari et al., 1990; Jung et al., 1991). Es wird vermutet, dass die T-Zellantwort gegen die Hüllproteine bereits sehr früh im Verlauf der Infektion, möglicherweise bereits in der präklinischen Phase, auftritt und nachfolgend durch hohe Konzentrationen an replizierendem Virus bzw. gebildetem HBsAg unterdrückt wird (Vento et al., 1987).

Die MHC II-restringierte Immunantwort gegen HBcAg und HBeAg spielt bei der Bekämpfung der HBV-Infektion eine zentrale Rolle, da hierdurch HBcAg-spezifische CTL aktiviert werden (Penna et al., 1991; Missale et al., 1993). Unter den verschiedenen für HBcAg identifizierten Epitopen induziert bei einer akuten Infektion vor allem das HBcAg-Epitop 50-69 bei einer Vielzahl von Patienten, unabhängig von deren MHC-Typ, eine spezifische

T-Helferzellantwort. Da dies bei chronischen Virusträgern nicht der Fall ist, wird für dieses Epitop ein kausaler Zusammenhang zwischen Virus-Eliminierung und T-Zellantwort vermutet (Ferrari et al., 1986; Ferrari et al., 1990; Jung et al., 1991).

In Übereinstimmung damit wurde im Woodchuck-Modell ein WHcAg-spezifisches Epitop identifiziert, welches bei einer akuten, selbst-limitierenden Infektion eine starke T-Zellantwort induziert. Bei einer chronischen Infektion hingegen ist eine zelluläre Immunantwort gegen dieses Peptid nicht nachweisbar (Menne et al., 1997).

Die MHC II-restringierte T-Zellantwort ist insbesondere in der Frühphase der Infektion von Bedeutung. Im Woodchuck-Modell wurde gezeigt, dass eine virusspezifische T-Helferzellantwort bereits drei Wochen nach der Infektion nachweisbar ist (Menne et al., 1998). In einer Studie mit einer begrenzten Anzahl von Patienten wurde während der Inkubationszeit eine CD4+ T-Zell-spezifische Immunantwort detektiert (Webster et al., 2000). Im Gegensatz dazu wurde in Depletionsexperimenten an Schimpansen gezeigt, dass CD4+ T-Lymphozyten sechs Wochen nach der Infektion keinen Einfluss mehr auf den Infektionsverlauf haben (Thimme et al., 2003).

1.4.2.2 Die MHC I-restringierte T-Zellantwort (Zytotoxische T-Lymphozyten)

HBV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten sind verantwortlich für die Reduktion der Viruslast im infizierten Gewebe.

In Patienten mit einer akuten, selbst-limitierenden Infektion wurden starke polyklonale CTL-Antworten gegen eine Vielzahl von Epitopen des Hüllproteins, des Nukleokapsidproteins und der Polymerase detektiert. Einige dieser CTL-Epitope, insbesondere HBcAg 18-27, HBsAg 183-191 und HBsAg 250-258, werden von der Mehrheit der infizierten Patienten erkannt, während andere Epitope nur bei wenigen Patienten eine Immunantwort hervorrufen. Daher kann für HBV eine Hierarchie der CTL-Antwort gegen die viralen Proteine vermutet werden (Penna et al., 1991; Nayersina et al., 1993).

Eine chronische Infektion hingegen ist durch eine schwache oder nicht nachweisbare CTL-Antwort gegen alle viralen Antigene im peripheren Blut gekennzeichnet (Rehermann et al., 1996a und 1996b). In der Leber

chronischer Virusträger wurde jedoch eine geringe Anzahl HBcAg-spezifischer CTL detektiert (Barnaba et al., 1989).

Für die Eliminierung von HBV wird virusspezifischen CTL eine doppelte antivirale Funktion zugeordnet: In der Anfangsphase der Infektion werden Zytokine wie IFN γ und TNF α freigesetzt, welche die virale Genexpression und Replikation vollständig inhibieren. Die Eliminierung des Virus aus dem Organismus erfolgt anschließend durch die Induktion der Apoptose der infizierten Zelle aufgrund der zytolytischen Aktivität der CTL.

So wurde der Zytokin-vermittelte inhibitorische Effekt von CTL auf die Virusreplikation nach adoptivem Immuntransfer im HBV-transgenen Mausmodell nachgewiesen (Guidotti et al., 1994). Verantwortlich für den antiviralen Effekt waren hier IFN γ und TNF α , da durch die Gabe von Antikörpern gegen diese Zytokine die Viruseliminierung gehemmt wurde. In HBV-infizierten Schimpansen wurde eine intrahepatische IFN γ -Produktion in Zusammenhang mit der Eliminierung des Virus gezeigt (Thimme et al., 2003).

Der zytotoxische Schritt der Viruseliminierung wurde ebenfalls im Mausmodell demonstriert: Der Transfer HBsAg-spezifischer CTL-Klone in HBsAg-positive transgene Mäuse hatte die Entwicklung einer nekroinflammatorischen Leberschädigung zur Folge (Moriyama et al., 1990). In Experimenten an HBV-infizierten Schimpansen wurde gezeigt, dass die Eliminierung des Virus durch CD8 $^{+}$ T-Zellen mit einer deutlichen Reduktion der Anzahl infizierter Hepatozyten einherging. Eine anhaltende Leberzellschädigung wurde biochemisch durch den Anstieg der Transaminasewerte nachgewiesen (Thimme et al., 2003).

1.5 Zielsetzung

Der Verlauf einer hepadnaviralen Infektion wird vor allem durch die Immunantwort der zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) bestimmt. Im Gegensatz zu der durch T-Helferzellen vermittelten Immunantwort, welche im Woodchuck-Modell gut charakterisiert ist, liegen derzeit keine Erkenntnisse über die Bedeutung der CTL-vermittelten Immunantwort während einer Infektion mit dem Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) vor.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, die virusspezifische CTL-Antwort im Murmeltiermodell zu charakterisieren.

1. Zur Methodenetablierung soll im ersten Teil die zelluläre Immunantwort gegen das virale Oberflächenprotein (WHsAg) in der Maus dargestellt werden. Im immunologisch gut etablierten Maussystem wird dazu ein durchflusszytometrisches Protokoll zur Kartierung von T-Zell-Epitopen verwendet, um die generelle Anwendbarkeit dieser Technik zu zeigen.
2. Nachdem im Maussystem T-Zellen gegen WHV-Proteine nachgewiesen wurden, ist es das Ziel, eine Nachweismethode für WHV-spezifische CTL im Murmeltier unter Verwendung des degranulationsassoziierten Proteins CD107a zu etablieren. Für die Durchführung dieser durchflusszytometrischen Analysen ist die Identifizierung eines spezifischen CD107a-Antikörpers notwendig, welche durch die Klonierung und Charakterisierung der Woodchuck-CD107a-Sequenz erleichtert werden soll.
3. Nach der Etablierung der Methode sollen CTL-Epitope innerhalb der viralen Proteine WHcAg und WHsAg bestimmt werden (*epitope mapping*).
4. Anschließend soll die virusspezifische CTL-Antwort im Verlauf der akuten WHV-Infektion sowie bei chronisch WHV-infizierten Tieren untersucht werden.
5. Zur genaueren Charakterisierung der Epitop-spezifischen CTL-Antwort soll eine Typisierung der MHC (*engl. major histocompatibility complex*) Klasse I-Proteine durchgeführt werden, da es sich bei Murmeltieren nicht um Inzuchttiere mit definiertem immungenetischem Hintergrund handelt.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Mäuse

Für die Experimente wurden Balb/c-Mäuse (Genotyp H-2D^{d/d}) eingesetzt, die zu Versuchsbeginn sechs bis acht Wochen alt waren (Harlan Winkelmann, BRD). Die Haltung erfolgte im Tierlabor des Instituts für Virologie unter Standardbedingungen (Standardfutter und Wasser *ad libitum*, 12h Tag-Nachtwechsel).

Murmeltiere

Die Versuche wurden mit amerikanischen Murmeltieren (*lat.* Marmota monax, *engl.* Woodchuck) durchgeführt. Wildgefangene Tiere wurden von North Eastern Wildlife (USA) bezogen, Nachzuchten stammten aus dem Tierlabor des Instituts für Virologie des Universitätsklinikums Essen. Die Tiere wurden dem deutschen Tierschutzgesetz entsprechend gehalten und tierärztlich betreut (Genehmigung der Bezirksregierung Düsseldorf, AZ 50.05-230-12/06).

2.1.2 Betäubungsmittel

Isofluran DeltaSelect	Delta Select GmbH (BRD)
Ketamin 10%	Ceva Tiergesundheit GmbH (BRD)
Xylazin 2%	Ceva Tiergesundheit GmbH (BRD)
T61	Intervet Deutschland GmbH (BRD)

2.1.3 Virusstämme

Die Virusstämme für Infektionsversuche wurden aus dem Serum chronisch WHV-infizierter Tiere gewonnen und bei -80°C gelagert.

2.1.4 Bakterien

Für die Herstellung kompetenter Zellen und die Transformation von Plasmiden wurde der *E.coli*-Stamm JM 109 verwendet. Für die Transformation von Ligationen kamen *E.coli*-Bakterien des Stammes TOP 10 One Shot™ der Firma Invitrogen (BRD) zum Einsatz. Der jeweilige Genotyp ist in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tab. 2.1: Genotyp der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
JM 109	<i>recA1 sapE44 endA1 hsdR17</i>
	<i>gurA96 relA1 thi(lac-proAB)</i>
	<i>F'[traD36proAB+lacI_q/lacZΔM15]</i>
TOP 10 One Shot™	<i>F'mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>
	<i>Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR</i>
	<i>recA1 araD139</i>
	<i>Δ(araleu)7697 galJ galK rpsL</i>
	<i>endA1 nupG</i>

2.1.5 Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Gibco (Karlsruhe), Merk (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München) bezogen.

Agar-Agar, Ampicillin, Bacto-Trypton, Bromphenolblau, BSA (Rinderserumalbumin), Cardiotoxin (Latoxan Frankreich), Dimethylsulfoxid, Dinatriumhydrogenphosphat, EDTA, Essigsäure, Ethanol, Ethidiumbromid, Ficoll (Biochrom AG BRD), Glycerol, Hefeextrakt, Ionomycin, Isopropanol, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhydrogenkarbonat, Kalziumchlorid, LB-Agar (Luria/Miller), LB-Medium (Luria/Miller), Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, β-Mercaptoethanol, Natriumacetat, Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, o-Phenylenediamine (OPD), Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), Salzsäure, Schwefelsäure, Tris-Borat, Trypanblau, Trypton, Tween 20, Wasserstoffperoxid, X-Gal, Xylencyanol

2.1.6 Reagenzien für die Zellkultur

Maus-Lymphozyten wurden in RPMI 1640-Medium (PAA Laboratories, Österreich) kultiviert; für Woodchuck-Lymphozyten wurde AIM V-Medium (Gibco Invitrogen, Deutschland) verwendet. Die Zellkulturmedien wurden jeweils mit 10% fötalem Kälberserum (FCS; Biochrom AG, Deutschland) und 10mg/ml Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories, Österreich) angereichert. Für *in vitro*-Stimulationsexperimente wurde Maus-Lymphozyten rekombinantes, murines Interleukin 2 (10000U/ml; Roche Applied Science, Deutschland) und Woodchuck-Lymphozyten rekombinantes, humanes Interleukin 2 (10000U/ml; Roche Applied Science, Deutschland) zugefügt.

Einfriermedium bestand aus 80% FCS, 10% DMSO und 10% Zellkulturmedium.

2.1.7 Peptide

Alle verwendeten Peptide wurden von emc microcollections (BRD) synthetisiert. Zur Anwendung kamen ein Satz von 36 synthetischen Pentadekameren sowie ein Satz von 82 Pentadekameren, welche die gesamte WHcAg-Sequenz (188 Aminosäuren) bzw. die gesamte WHsAg-Sequenz (431 Aminosäuren) des Virusstammes WHV 8 überspannen. Diese Peptide überlappen jeweils um zehn Aminosäuren und wurden in sechs Pools zu je sechs Peptiden vereinigt.

Als Negativkontrolle diente ein vom humanen Zytomegalievirus (*engl. cytomegalovirus*, CMV) abgeleitetes Peptid (YILEETSVM).

Die Aminosäuresequenzen der verwendeten Peptide sind im Anhang tabellarisch aufgelistet.

2.1.8 Antikörper

Die für die Durchflusszytometrie eingesetzten Antikörper sind mit unterschiedlichen Fluorochromen konjugiert. Alle verwendeten Fluorochrome absorbieren Licht der Wellenlänge 488nm bzw. 633nm und werden dadurch zur Emission von Licht unterschiedlicher Wellenlänge angeregt, welches mithilfe des Durchflusszytometers detektiert werden kann. In Tabelle 2.2 sind die Charakteristika der Fluorochrome aufgeführt.

Tab. 2.2: Absorptions- und Emissionsmaximum der Fluorochrome

Bezeichnung	Absorptions- maximum (nm)	Emissions- maximum (nm)
FITC	488	525
PE	488	575
PerCP	488	670
APC	633	660

Für die Durchflusszytometrie von Maus-Lymphozyten wurden die in Tabelle 2.3 genannten monoklonalen Antikörper verwendet. Diese wurden von BD Pharmingen (BRD) bezogen. Antikörper und Konjugate für die Durchflusszytometrie von Woodchuck-Lymphozyten sowie für andere Experimente sind aus den Tabellen 2.4 und 2.5 ersichtlich.

Tab. 2.3: Monoklonale Antikörper für Maus-Lymphozyten

Antikörper	Fluorochrom	Beschreibung	Klon	Hersteller
α -CD4	PerCP	anti-Maus CD4	L3T4(RM4-5)	BD Pharmingen
α -CD8	FITC	anti-Maus CD8a (Ly2)	53-6.7	BD Pharmingen
α -CD43	PE	anti-Maus CD43	1B11	BD Pharmingen
α -IFN γ	APC	anti-Maus IFN γ	XMG1.2	BD Pharmingen

Tab. 2.4: Antikörper für Woodchuck-Lymphozyten

Antikörper	Fluorochrom	Beschreibung	Klon	Hersteller
α -CD3	-	polyklonal Kaninchen anti-human	-	DakoCytomation (Dänemark)
α -IgG	PE	polyklonal Esel anti-Kaninchen	-	Abcam (UK)
α -CD4	FITC, PE, PerCP	monoklonal Maus anti-human	L200	BD Pharmingen (BRD)
α -CD107a	FITC	monoklonal Ratte anti-Maus	1D4B	BD Pharmingen (BRD)

Tab. 2.5: Sonstige Antikörper und Konjugate

Antikörper	Beschreibung	Klon	Verwendung	Hersteller
α -CD28	gereinigt	37.51	Kostimulation	BD Pharmingen (BRD)
α -Maus IgG ₁	HRP-konjugiert anti-Maus IgG ₁	X56	ELISA	BD Pharmingen (BRD)
α -Maus IgG _{2a}	HRP-konjugiert anti-Maus IgG _{2a}	R19-15	ELISA	BD Pharmingen (BRD)
Protein G	Peroxidase-konjugiert, rekombinant	-	ELISA	Sigma

2.1.9 Plasmide

Die DNA-Vakzinierungen (s.2.2.1.3) wurden mit dem Vektor **pcDNA3** von Invitrogen (BRD) durchgeführt. Die durch Insertion der WHcAg- bzw. der preS2/S-WHsAg-Sequenz entstandenen Immunisierungsvektoren pWHclm bzw. pWHslm wurden freundlicherweise von Dr. M. Lu (Institut für Virologie, Universität Duisburg-Essen) zur Verfügung gestellt. Die Herstellung dieser Plasmide im Forschungsmaßstab erfolgte durch PlasmidFactory (BRD).

Für die Klonierung von PCR-Amplifikaten wurde der im TOPO™ TA Cloning® Kit enthaltene Vektor **pCR®2.1-TOPO** eingesetzt (s.2.2.7.6).

2.1.10 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen biomers.net (BRD) und Hermann GbR Synthetische Biomoleküle (BRD) bezogen.

Tab. 2.6: Oligonukleotide

Primer	Orientierung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
Y2	sense	GCGGGTGATGGCCCCACGAACGCTGCTC	MHCI-Bestimmung
Y3	sense	CATGCCATGGGCTCCCACTCTACGAG	MHCI-Bestimmung
Y4	anti-sense	GAAGATCTTCCTTCCCGTGCTCC	MHCI-Bestimmung
Y5	anti-sense	GGAAGATCTTCACACTTTCTCAG	MHCI-Bestimmung
Y7	anti-sense	GGAAGATCTTCCTCTCTCCATTGCC	MHCI-Bestimmung
1s	sense	ATTRCTTTTGAAGAGGAYA	CD107a-Klonierung
2as	anti-sense	AGCAAAATTAACACCGTCATT	CD107a-Klonierung
3as	anti-sense	GYTGCAAGATGAACTTCACAT	CD107a-Klonierung
4s	sense	CACYATCCAGGCSTACCT	CD107a-Klonierung
5as	anti-sense	TATTTARRAAAGTGSCAGC	CD107a-Klonierung
6as	anti-sense	GCGTGACTCCTCTTCCTGCC	CD107a-Klonierung
7as	anti-sense	GGCRATGAGGACGAYGAGGA	CD107a-Klonierung
wc1	sense	TGGGGCATGGATATAGATCC	Real time-PCR
wc149s	anti-sense	AAGATCTCTAAATGACTGTATGTTCCG	Real time-PCR

R=AG, Y=CT, S=GC

2.1.11 Puffer und Lösungen

6x DNA-Probenpuffer	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 30% Glycerol in H ₂ O
PBS	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na ₂ HPO ₄ ; KH ₂ HPO ₄ ad 1l H ₂ O; pH 7,4
Carbonat-Puffer pH 9,6	3,18 g Na ₂ CO ₃ 5,88 g NaHCO ₃ 0,2 g NaN ₃ ad 1l H ₂ O
Waschpuffer (ELISA)	PBS 1% (v/v) Tween 20
Waschpuffer I (FACS)	PBS 0,1% (m/v) BSA 0,02% (m/v) Natriumazid
Waschpuffer II (FACS; Maus)	PBS 1x PermWashBuffer 0,1% (m/v) BSA 0,02% (m/v) Natriumazid
Waschpuffer III (FACS; Woodchuck)	PBS 1x PermWashBuffer 5% (m/v) BSA 0,02% (m/v) Natriumazid
TBE-Puffer	45 mM Tris-Borat 1 mM EDTA
OPD-Substratlösung	o-Phenylendiamin (1 Tablette) 10 ml PBS 10 µl H ₂ O ₂
Stopplösung	0,5 N H ₂ SO ₄

2.1.12 Kommerzielle Standardtests

BD Cytofix/Cytoperm™	BDPharmingen (BRD)
<i>enthält:</i> Fixierungs-/Permeabilisierungslösung, 10x PermWashBuffer	
FastStart SYBR Green Master	Roche (BRD)
<i>enthält:</i> ready-to-use Mastermix	
Plasmid Mini Kit	Qiagen (BRD)
QiaAmp DNA Mini Kits	Qiagen (BRD)
QiaQuick Gel Extraction Kit	Qiagen (BRD)
QiaShredder	Qiagen (BRD)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (BRD)
TOPO™ TA Cloning® Kit (Version R)	Invitrogen (BRD)

2.1.13 Reagenzien für die Molekularbiologie

Taq DNA Polymerase (5U/μl)	Promega GmbH (BRD)
10x Reaktionspuffer	Promega GmbH (BRD)
MgCl ₂ (25mM)	Promega GmbH (BRD)
dNTP (10mM)	Promega GmbH (BRD)
100 bp-DNA-Leiter plus	fermentas (BRD)
EcoRI (50U/μl)	Boehringer Roche (BRD)
M-MLV RT 5x Reaktionspuffer	Promega GmbH (BRD)
M-MLV Reverse Transcriptase (200U/μl)	Promega GmbH (BRD)

2.1.14 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Eppendorf (BRD), Greiner Labortechnik (BRD), NUNC (BRD) und Falcon (BRD) bezogen.

2.1.15 Geräte

Autoklav	Lautenschläger (BRD)
Bakterienschüttler	Oehmen Labortechnik (BRD)
CO ₂ -Inkubator.....	Heraeus (BRD)
Durchflusszytometer	<i>FACSCalibur</i> BD (BRD)
Elektrophoresekammern	Medizintechnik, Universitätsklinikum Essen (BRD)
Elektrophorese-Netzgerät	<i>PowerPack P25</i> Biometra (BRD)
ELISA-Reader	SorinBiomedica (Italien)
Geldokumentationsanlage	<i>GeneGeniusBioImaging System</i> Synoptics (UK)
Inversmikroskop	Carl Zeiss AG (BRD)
Kühlschrank	<i>Comfort</i> LIEBHERR (BRD)
Laminarbank	<i>HeraSafe</i> Heraeus (BRD)
Mikrowellenherd	Panasonic Deutschland (BRD)
PCR-Geräte	<i>Mastercycler gradient</i> Eppendorf (BRD) <i>PxE0.5 Thermal Cycler</i> ThermoScientific (USA) <i>LightCycler 2.0</i> Roche (BRD)
pH-Meter	<i>MP220 pH Meter</i> MettlerToledo (BRD)
Pipetten	Eppendorf (BRD), Gilson (USA)
Spektralphotometer	<i>Gene Quant pro</i> Amersham Bioscience (USA)
Thermomixer	<i>ThermoStatplus</i> Eppendorf (BRD)
UV-Tisch	<i>FLX-20M</i> MWG-Biotech (BRD)
Vortexer	<i>Vortex Genie2</i> Scientific Industries (USA)
Waagen.....	Sartorius AG (BRD)
Wasserbad	Julabo (BRD)
Zählkammer (Neubauer)	Oehmen Labortechnik (BRD)
Zentrifugen	<i>5415C, 5810</i> Eppendorf (BRD) <i>Megaforce 1.0R</i> Heraeus Instruments (BRD)

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

2.2.1.1 Narkotisierung

Die Mäuse wurden für retroorbitale Blutentnahmen und intramuskuläre Immunisierungen für einen Zeitraum von wenigen Minuten betäubt. Dazu wurden die Tiere in ein Glasgefäß gesetzt, in dem sich ein mit Isofluran getränktes Tuch befand. Sobald die Tiere eine flache Atmung aufwiesen, wurden sie aus dem Gefäß genommen.

Die Murmeltiere wurden für Blutentnahmen, Immunisierungen und Operationen narkotisiert. Dazu wurde den Tieren ein Gemisch aus 4 ml Ketamin und 1 ml Xylazin intramuskulär injiziert.

2.2.1.2 WHV-Infektion

Die WHV-Infektion der Murmeltiere wurde mit einer 0,9 x 40mm-Kanüle intravenös in die Vena saphena durchgeführt. Dazu wurde der Virusstock mit 0,5ml sterilem PBS verdünnt. Es wurde mit 1×10^7 WHV-Genomäquivalenten pro Tier infiziert.

2.2.1.3 DNA-Immunisierung

Die DNA-Immunisierungen wurden an betäubten Tieren durchgeführt (s.2.2.1.1).

Sieben Tage vor der ersten Immunisierung wurde den Mäusen intramuskulär 100µl Cardiotoxin (10µM in PBS) injiziert, um die Effizienz des Gentransfers zu verbessern (Davis et al., 1994). Die Immunisierung erfolgte durch intramuskuläre Injektion von 100 µg in PBS gelöster Plasmid-DNA mittels einer 0,4 x 19mm-Kanüle. Drei Vakzinierungen wurden im Abstand von jeweils zwei Wochen vorgenommen (Abb.2.1).

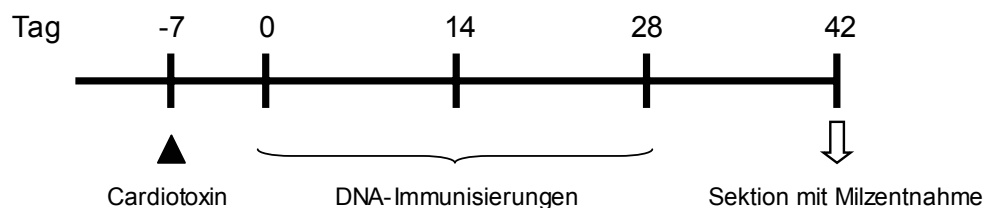


Abb. 2.1: Versuchsablauf der DNA-Immunisierungen. Sieben Tage vor der ersten Immunisierung erhielten die Mäuse eine Cardiotoxininjektion. Drei DNA-Immunisierungen wurden im Abstand von 14 Tagen durchgeführt. Die Milzentnahme erfolgte 14 Tage nach der letzten Immunisierung.

2.2.1.4 Blutentnahmen

Die Blutentnahme bei Mäusen erfolgte retroorbital mit einer 3mm-Glaskapillare. Das Blut wurde in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß aufgefangen und auf Eis gelagert. Zur Serumgewinnung wurde das gewonnene Blut zwei Minuten bei 6000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Serum wurde bei -80°C gelagert.

Die Blutentnahme bei Murmeltieren (Serum/ EDTA-Blut) erfolgte nach Ketamin/Xylazin-Narkose (s.2.2.1.1) aus der Vena saphena mittels einer 0,9 x 40mm-Kanüle. Es konnten jeweils 2-3 ml Serum und 5-8 ml EDTA-Blut gewonnen werden.

2.2.1.5 Organentnahme

Mäuse wurden zur Milzentnahme mit Isofluran betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Die Organentnahme bei Murmeltieren erfolgte nach Betäubung mit Ketamin/Xylazin und anschließender Euthanasierung durch intrakardiale Gabe von T61.

Die Bauchhöhle wurde geöffnet, die Milz bzw. mesenteriale Lymphknoten entnommen und in ein Gefäß mit 3 ml eiskaltem PBS gelegt.

2.2.1.6 Wiederholte Milzteilentnahme bei Murmeltieren

Für einige Stimulationsexperimente war es nötig, autologe Splenozyten von immunen Murmeltieren zu verwenden. Von drei Tieren wurden daher wiederholt Milzbiopsien entnommen. Die Operationen wurden fachgerecht von Frau PD Dr. med. U. Dahmen (Universitätsklinikum Essen, Abteilung für Allgemeine und Transplantationschirurgie) im Tierlabor des Instituts für Virologie durchgeführt.

Dabei wurde die Bauchhöhle mit einer medianen Laparatomie geöffnet. Die oberen Polgefäße der Milz wurden dargestellt und ligiert. Das sich so demarkierende Milzareal wurde abgeklemmt und reseziert. Zur Vermeidung von Blutungen wurde der Milzstumpf unterbunden. Anschließend erfolgte der schichtweise Wundverschluss.

Im Hinblick auf das Wohlergehen der Tiere und die Vitalität der Splenozyten wurden zwei bis drei serielle Splenektomien im Abstand von zwei Wochen durchgeführt.

2.2.2 Präparation von Zellen aus der Milz und aus mesenterialen Lymphknoten

Die Milz bzw. die mesenterialen Lymphknoten wurden durch Zerreiben in einer Zellkulturschale zerkleinert. Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen wurde das Zellmaterial in PBS aufgenommen und über ein 70 µm-Zellsieb gegeben. Im Anschluss daran wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und danach die Zellzahl bestimmt (s.2.2.4.2). Nach der Aufnahme in komplettem AIM V-Medium wurden die Zellen für *in vitro*-Stimulationsexperimente (s.2.2.5) eingesetzt.

2.2.3 Isolierung von Leukozyten aus peripherem Blut von Murmeltieren

Die Trennung der mononukleären Zellen aus peripherem Blut (*engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMC*) erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu wurden 15 ml Ficoll in einem 50 ml-Separationsröhrchen (Leucosep®) vorgelegt und mit PBS-verdünntem Blut überschichtet. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 1200 x g und Raumtemperatur wurde der Leukozytensaum an der Interphase zwischen Ficoll und zellfreiem Plasma abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in komplettem AIM V-Medium aufgenommen und für *in vitro*-Stimulationsexperimente (s. 2.2.5) eingesetzt.

2.2.4 Zellkulturtechniken

2.2.4.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur längeren Lagerung von Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dazu wurden bis zu 1×10^7 Zellen in 1-2ml Einfriermedium resuspendiert. Je 1 ml dieser Zellsuspension wurde in ein Einfrier Röhrchen überführt, welches in einem Einfriergefäß oder Styroporbehälter bei -80°C eingefroren wurde. Nach zwei bis drei Tagen erfolgte das Umsetzen des Röhrchens in flüssigen Stickstoff (-196°C).

Zum Auftauen der Zellen wurden diese schnell bei 37°C erwärmt und sofort mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen gezählt und zur RNA-Isolation eingesetzt.

2.2.4.2 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde die Einzelzellsuspension 1:10 verdünnt, mit Trypanblau versetzt und in einer Neubauerkammer gezählt.

Trypanblau färbt tote Zellen an. Für die Zellzahlbestimmung wurden nur lebende Zellen gezählt.

2.2.5 *In vitro*-Stimulation mit WHV-Peptiden

In einer 24-well-Platte wurden pro Vertiefung 1×10^6 bis 5×10^6 Milz- bzw. Lymphknotenzellen in insgesamt 2 ml komplettem Zellkulturmedium für sechs Tage kultiviert. Zur Stimulation wurden Peptidpools oder Einzelpeptide in einer Endkonzentration von 2 µg/ml pro Peptid zugefügt. Nach drei Tagen erfolgte die Zugabe von 10 U/ml rekombinanten, humanem IL2 für Woodchuck-Zellen bzw. rekombinanten, murinen IL2 für Maussplenozyten.

Zur Stimulation von Woodchuck-PBMC wurden 1×10^6 Zellen pro Vertiefung für zwei Tage in 96-well-Flachbodenplatten in 200 µl komplettem AIM-V-Medium unter Zugabe von 2 µg/ml Peptidpools oder Einzelpeptid kultiviert.

Die so stimulierten Zellen wurden nach Restimulation für die intrazelluläre Zytokinfärbung (s.2.2.6.1) oder den CD107a-Degranulationstest (s.2.2.6.2) eingesetzt.

2.2.6 Durchflussszytometrie

Die Durchflussszytometrie ist eine Technik zur Analyse von einzelnen Zellen oder Zellsubpopulationen aus einer heterogenen Zellpopulation. Dabei werden die zu messenden Zellen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln durch die Messzelle des Durchflussszytometers geleitet und mit Laserlicht einer definierten Wellenlänge bestrahlt. Aufgrund der Streuung und Reflexion des Lichts durch die unterschiedlichen Zellbestandteile erhält man Informationen über die Größe und Morphologie (Granularität) der Zellen.

Durch den Einsatz von spezifischen, Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen verschiedene Proteine der Zelle kann die Expression dieser Moleküle auf der Zellmembran oder innerhalb der Zelle analysiert werden. Hierzu werden die Fluorochrome durch das Laserlicht zur Fluoreszenz angeregt. Das emittierte Licht wird in den Detektionseinheiten des Durchflussszytometers detektiert und das Signal elektronisch verstärkt. In der nachfolgenden Rechner-gestützten

Multiparameteranalyse werden dann die zeitgleich aufgenommenen Parameter kombiniert und die entsprechenden Zellpopulationen analysiert.

2.2.6.1 Intrazelluläre Zytokinfärbung (intracellular cytokine staining, ICS)

Die intrazelluläre Zytokinfärbung wurde zur Detektion Interferon γ (IFN γ)-produzierender Maus-T-Zellen durchgeführt.

Nach sechs Tagen *in vitro*-Stimulation (s.2.2.5) erfolgte eine Restimulation der Lymphozyten. Dazu wurden die Zellen in 96-well-Rundbodenplatten überführt und für fünf Stunden mit 200 μ l pro Vertiefung komplettem RPMI1640-Medium restimuliert, das 2 μ g/ml Peptidpools oder Einzelpeptide enthielt. Pro Ansatz wurden des Weiteren 1 μ g/ml α -CD28-Antikörper als Kostimulator sowie 5 μ g/ml Brefeldin A zur Inhibierung der IFN γ -Sekretion zugesetzt. Für die Positivkontrolle wurden Zellen mit 400 ng/ml PMA und 10 μ g/ml Ionomycin stimuliert.

Nach fünf Stunden Restimulation wurden die Zellen einmal mit 200 μ l Waschpuffer I gewaschen. Anschließend erfolgte die Oberflächenfärbung mit den Antikörpern gegen CD4, CD8 und CD43 für 15 Minuten bei 4°C, gefolgt von einem Waschschrift mit 100 μ l Waschpuffer I. Unter Verwendung der Fixierungs- und Permeabilisierungslösung des Cytofix/Cytoperm-Kits wurden die Zellen für 15 Minuten bei 4°C fixiert und permeabilisiert und anschließend mit 100 μ l Waschpuffer II gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte die intrazelluläre Zytokinfärbung für 25 Minuten bei 4°C mit einem abschließenden Waschschrift mit 100 μ l Waschpuffer II.

In Tabelle 2.7 sind die Antikörper aufgelistet, welche für die intrazelluläre Zytokinfärbung stimulierter Mausmilzzellen verwendet wurden.

Tab. 2.7: Antikörper für die intrazelluläre Zytokinfärbung

Antikörper	Fluorochrom	Verdünnung	Verdünnungspuffer
α -CD4	PerCP	1:200	Waschpuffer I
α -CD8	FITC	1:100	Waschpuffer I
α -CD43	PE	1:1200	Waschpuffer I
α - IFN γ	APC	1:200	Waschpuffer II

2.2.6.2 CD107a-Degranulationstest

Zur Analyse stimulierter Woodchuck-Zellen wurde der CD107a-Degranulationstest durchgeführt.

Die Restimulation von Woodchuck-Lymphozyten der Milz bzw. aus Lymphknoten wurde nach sechs Tagen *in vitro*-Stimulation vorgenommen; Woodchuck-PBMC wurden nach zwei Tagen restimuliert. Dazu wurden die Zellen in 96-well-Rundbodenplatten überführt und für fünf Stunden mit 200µl komplettem AIM-V-Medium restimuliert, das 2 µg/ml Peptidpools oder Einzelpeptide enthielt. Während der Restimulation wurde den Zellen ein α -CD107a Antikörper (Tab. 2.8) zugegeben. Dadurch wurde das Anfärben von CD107a-Molekülen gewährleistet, welche durch den Degranulationsvorgang an die Zelloberfläche gelangten.

Nach fünf Stunden Restimulation wurden die Lymphozyten einmal mit 200µl Waschpuffer I gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung mit einem α -CD4 Antikörper für 15 Minuten bei 4°C, gefolgt von einem Waschschrift mit 100µl Waschpuffer I. Unter Verwendung der Fixierungs- und Permeabilisierungslösung des Cytofix/Cytoperm-Kits wurden die Zellen für 15 Minuten bei 4°C fixiert und permeabilisiert. Nach Waschen mit 100µl Waschpuffer III wurden die Zellen mit einem primären α -CD3 Antikörper und einem sekundären α -IgG Antikörper für jeweils 25 Minuten bei 4°C mit anschließendem Waschschrift mit 100µl Waschpuffer III gefärbt.

In Tabelle 2.8 sind die Antikörper zusammengefasst, die für den CD107a-Degranulationstest verwendet wurden.

Tab. 2.8: Antikörper für den Woodchuck-CD107a-Degranulationstest

Antikörper	Beschreibung	Fluorochrom	Verdünnung	Verdünnungspuffer
α -CD107a	anti-Maus CD107a	FITC	1:100	komplettes AIM-V
α -CD4	anti-human CD4	PerCP	1:100	Waschpuffer I
α -CD3	Kaninchen anti-human CD3	-	1:80	Waschpuffer III
α -IgG	anti-Kaninchen IgG	PE	1:150	Waschpuffer III

2.2.6.3 Datenanalyse

Die Daten wurden mit einem *FACSCalibur* Durchflusszytometer und der Software *CellQuest* (BectonDickinson, USA) aufgenommen. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der Software *FlowJo* (TreeStar, USA).

2.2.7 Molekularbiologische Arbeiten

2.2.7.1 Isolation von Gesamt-RNA und cDNA-Synthese

Die Gesamt-RNA von Woodchuck-Lymphozyten wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit gemäß dem Standardprotokoll isoliert.

Für die Synthese von cDNA wurden 1µg Gesamt-RNA mit 0,5µg Primer Y7 für fünf Minuten bei 70°C erhitzt und dann sofort auf Eis gekühlt. Nach Zugabe der in Tabelle 2.9 aufgelisteten Reagenzien wurde der Reaktionsansatz für 60 Minuten bei 42°C inkubiert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

Die so hergestellte cDNA wurde zur Bestimmung des MHC Klasse I-Status (s.2.2.7.3) verwendet.

Tab. 2.9: Reagenzien für die cDNA-Synthese

Reagenz	Endkonzentration
M-MLV RT 5x Reaktionspuffer	1x
dNTP (10mM)	1mM
H ₂ O	ad 25µl
MMLV-RT	200U

2.2.7.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt.

Sie errechnet sich wie folgt:

$$\text{Konzentration (in } \mu\text{g/ml)} = \text{gemessene OD}_{260\text{nm}} \times \text{Faktor der Verdünnung} \times \text{Faktor F}$$

Faktor F beträgt: 50 für doppelsträngige DNA
 40 für doppelsträngige RNA
 33 für einzelsträngige Oligonukleotide

Bildet man den Quotienten aus dem OD-Wert bei 260 nm und dem OD-Wert bei 280 nm, lässt sich eine Aussage über die Reinheit der Probe treffen. Reine DNA weist einen Wert von 1,8 auf. Wegen des Absorptionsmaximums von Proteinen bei 280 nm weisen verunreinigte Proben deutlich kleinere Quotienten auf.

2.2.7.3 Bestimmung des MHC Klasse I-Status

Zur Bestimmung des MHC Klasse I-Status wurde die unter 2.2.7.1 hergestellte cDNA als Matrize in einer PCR eingesetzt.

Aus Tabelle 2.10 ist die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für diese PCR ersichtlich. Tabelle 2.11 beschreibt die PCR-Bedingungen.

Tab. 2.10: Reaktionsansatz für die MHC Klasse I-PCR

Reagenz	Endkonzentration
10 x Puffer	1 x
MgCl ₂	2 mM
dNTPs	0,2 mM
Primer	1 µM
Polymerase	0,5 U/Ansatz
Matrize (cDNA)	5 µl/Ansatz
H ₂ O	ad 50µl

Tab. 2.11: PCR-Bedingungen für die MHC Klasse I-PCR

Zyklusschritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Zyklenzahl
Denaturierung	94	4	1
Denaturierung	94	1	30
Annealing	55	1	
Elongation	72	2	
Delay	72	7	1

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden nach der Elektrophorese (s.2.2.7.5) aus dem Gel ausgeschnitten, mittels des TOPO™ TA Cloning® Kits kloniert (s.2.2.7.6) und anschließend sequenziert (s.2.2.7.9).

2.2.7.4 Klonierung der Woodchuck-CD107a-DNA-Sequenz

Für die Klonierung der Woodchuck-CD107a-DNA-Sequenz wurde eine cDNA-Bibliothek, die aus RNA von Woodchuck-PBMC hergestellt worden war, als Matrize in einer PCR eingesetzt. Diese Bibliothek wurde freundlicherweise von Dr. M. Lu (Institut für Virologie, Universität Duisburg-Essen) zur Verfügung gestellt. Die Primer wurden anhand der Nukleotidsequenzen des humanen bzw. des murinen CD107a konstruiert.

Ein Reaktionsansatz setzte sich wie Tabelle 2.12 beschrieben zusammen.

Tab. 2.12: Reaktionsansatz für die Woodchuck-CD107a-Klonierungs-PCR

Reagenz	Endkonzentration
10 x Puffer	1x
MgCl ₂	2 mM
dNTPs	0,2 mM
Primer	1 µM
Polymerase	0,5 U/Ansatz
Matrize (library)	5 µl/Ansatz
H ₂ O	ad 50µl

Zur Erhöhung der Spezifität wurde ein „touchdown“-PCR-Protokoll gewählt. Dabei ist die Annealingtemperatur in den ersten Zyklen wenige Grad höher als die Schmelztemperatur der Primer und wird in den folgenden Amplifikationsrunden schrittweise gesenkt (Tab. 2.13).

Tab. 2.13: PCR-Bedingungen für die Woodchuck-CD107a-Klonierungs-PCR

Zyklusschritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)	Zyklenzahl
Denaturierung	94	4	1
Denaturierung	94	1	3
Annealing	60	1	
Elongation	72	2	
Denaturierung	94	1	3
Annealing	58	1	
Elongation	72	2	
Denaturierung	94	1	27
Annealing	56	1	
Elongation	72	2	
Delay	72	7	1

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden nach der Elektrophorese (s.2.2.7.5) aus dem Gel ausgeschnitten, mittels des TOPO™ TA Cloning® Kits kloniert (s.2.2.7.6) und anschließend sequenziert (s.2.2.7.9).

2.2.7.5 DNA-Gelelektrophorese

Zur Auswertung der PCR wurden die amplifizierten DNA-Fragmente elektrophoretisch in horizontalen 1%igen Agarosegelen bei 8V/cm² in TBE-Puffer aufgetrennt. Die Gele enthielten den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid, um eine anschließende Auswertung unter UV-Licht (254 nm) zu ermöglichen. Für eine Größenabschätzung der PCR-Produkte wurden 2 µl einer 100-bp-DNA-Leiter als Längenstandard eingesetzt. Zur Dokumentation wurde das Gel fotografiert.

2.2.7.6 Gelextraktion und Klonierung

Die zu klonierenden DNA-Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des QIAquick Gel Extraction-Kits extrahiert. Die Klonierungen wurden unter Verwendung des TOPO™ TA Cloning® Kits nach Herstellerangaben durchgeführt.

Dazu wurden die DNA-Fragmente in den pCR2.1 TOPO-Vektor ligiert. Die Transformation der TOP 10 One Shot™-Zellen mit anschließender Blau-weiß-Selektion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Der Transformationserfolg wurde durch eine Bakterien-Kolonie-PCR (s.2.2.7.7) überprüft. Positive Klone wurden in LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin überführt und nach 16-stündiger Inkubation bei 37°C zur Plasmidisolierung eingesetzt.

2.2.7.7 Bakterien-Kolonie-PCR

Die Bakterien-Kolonie-PCR wurde eingesetzt, um bei transformierten Ligationen positive Klone detektieren zu können. Dazu wurde eine Bakterienkolonie gepickt, auf eine frische LB-Platte überführt und der Rest der Bakterien in 30 µl H₂O resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei 94°C und Zentrifugation bei 15000 x g für zwei Minuten wurden 5 µl dieses Ansatzes als DNA-Matrize in einer PCR (s.2.2.7.3 und 2.2.7.4) eingesetzt.

2.2.7.8 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus E.coli-Kulturen (s.2.2.7.6) erfolgte mit dem Plasmid Mini Kit gemäß dem Standardprotokoll.

2.2.7.9 Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen wurden von dem Zentralen DNA-Sequenzierservice des Universitätsklinikums Essen oder der Firma AGOWA (BRD) nach aktuellen Standards durchgeführt.

Die DNA wurde nach den von diesen Labors geforderten und dort einzusehenden Vorgaben aufgearbeitet.

2.2.7.10 Quantitative PCR

Die quantitative PCR (qPCR) dient der quantitativen Bestimmung der Genexpression innerhalb einer DNA- bzw. cDNA-Probe. Ein Standardverfahren beruht auf der Verwendung des interkalierenden Farbstoffes SYBRGreen. Die Menge des DNA-Amplifikats in einer PCR wird dabei durch erhöhte Fluoreszenz bei der Einlagerung von SYBRGreen in die doppelsträngige DNA bestimmt. Der Amplifikationszyklus, bei dem sich durch eine Zunahme der Fluoreszenz die Bildung eines Amplifikates zeigt, wird als C_T -Wert bezeichnet. In Relation zu einem definierten Standard kann damit die Kopienzahl des Gens in der Probe errechnet werden.

Um die Spezifität der entstandenen Amplifikation zu überprüfen, wird in der Regel eine Schmelzpunktbestimmung der PCR-Produkte direkt nach der Amplifikation durchgeführt. Die PCR-Produkte schmelzen bei unterschiedlichen Temperaturen in Abhängigkeit der Zahl ihrer Basenpaare und ihres G/C-Gehaltes. Der gemessene Schmelzpunkt ist daher für ein gegebenes Amplifikat spezifisch.

2.2.7.11 Quantifizierung von WHV-DNA im Serum

Mit Hilfe des QiaAmp DNA Mini Kits wurde virale DNA aus 100µl Woodchuckserum isoliert.

Die WHV-DNA wurde mittels Real time (RT)-PCR unter Verwendung des *FastStart SYBR Green Master* quantifiziert. Die Messung erfolgte auf dem Light Cycler 2.0 von Roche.

Ein Reaktionsansatz setzte sich wie in Tabelle 2.14 beschrieben zusammen. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 2.15 gezeigt.

Tab. 2.14: Reaktionsansatz für die RT-PCR

Reagenz	Volumen (µl)
H ₂ O	13,2
Mastermix	4
Primer	je 0,4
Matrize	2

Tab. 2.15: Reaktionsbedingungen für die RT-PCR

Zyklusschritt	Temperatur (°C)	Dauer (s)	Temperatur- änderungsrate (°C/s)	Zyklenzahl
Denaturierung	50	120	20	1
	95	120	20	
PCR	95	5	20	45
	53	10	20	
	72	10	2	
Schmelzpunkt- bestimmung	95	0	20	1
	63	15	20	
	95	0	0.1	

Die Isolierung und Quantifizierung viraler DNA mittels Real time-PCR wurden von Frau Thekla Kemper durchgeführt.

Die Auswertung der C_T-Werte erfolgte mit der Light Cycler Software 3.5.3.

Als Standard wurde ein Plasmid, welches das Vollängen-WHV-Genom enthält, in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt.

Die Nachweisgrenze dieses Tests lag bei 10³ Genomäquivalenten pro Reaktionsansatz.

2.2.8 Bestimmung WHV-spezifischer Antikörper (ELISA) im Maus- und im Woodchuckserum

Für den Nachweis WHV-spezifischer Antikörper wurden ELISA-Platten mit dem entsprechenden viralen Antigen beschichtet. Dazu wurden je 100µl einer Lösung von 10µg/ml Antigen in Carbonat-Puffer in die Vertiefungen gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 200µl Waschpuffer folgten die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit

5% FCS in PBS für eine Stunde bei 37°C und erneutes dreimaliges Waschen. Im Anschluss daran wurde Mausserum in einer Verdünnung von 1:50 in 100µl PBS pro Vertiefung für eine Stunde bei 37°C inkubiert. An einen erneuten Waschschrift schloss sich die Zugabe von 100µl pro Vertiefung in PBS verdünntem (1:1000), Peroxidase-konjugiertem α -Maus IgG-Antikörper an. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und dreimaligem Waschen wurden 100µl der OPD-Substratlösung hinzu gegeben, fünf bis 15 Minuten im Dunkeln inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 100µl Stopplösung abgestoppt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 490nm (Referenzfilter 630nm).

Die Detektion WHV-spezifischer Antikörper in Woodchuckserum wurde analog zum Antikörperrnachweis in Mausserum durchgeführt. Im Unterschied zu diesem erfolgte jedoch anstatt der Zugabe des Peroxidase-konjugierten α -Maus IgG-Antikörpers die Zugabe von Peroxidase-gekoppeltem Protein G. Dieses wurde 1:1000 in PBS verdünnt und 100µl pro Vertiefung hinzu gegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Intrazelluläre Zytokinfärbung (intracellular cytokine staining, ICS) muriner Milzzellen

Die zellulären Immunantworten gegen HBV, insbesondere gegen das Hüllprotein HBsAg sind gut charakterisiert. Auch im Mausmodell wurden HBsAg-spezifische Epitope charakterisiert (Schirmbeck et al., 2001; Sette et al., 2001). Im ersten Teil dieser Arbeit sollte daher zur Methodenoptimierung die zelluläre Immunantwort gegen das virale Oberflächenprotein von WHV (WHsAg) nach DNA-Vakzinierung im Mausmodell untersucht werden. Voraussetzung dafür war die Etablierung eines Stimulationsprotokolls zum Nachweis antigenspezifischer T-Lymphozyten. Die anschließende Detektion erfolgte durch intrazelluläre Zytokinfärbung, mit der die Interferon γ (IFN γ)-Produktion nach Peptidstimulation nachgewiesen wurde.

Dazu wurden Balb/c-Mäuse mit Plasmiden, welche für die preS2/S-Region des WHsAg kodieren, immunisiert, die Milzzellen zwei Wochen nach der letzten Immunisierung isoliert und *in vitro* mit Peptidpools stimuliert, welche die preS2/S-Region des WHsAg abdecken (Abb. 3.1). Nach einer Restimulation am sechsten Tag erfolgte die Färbung mittels Antikörpern gegen die T-Zellmarker CD4 und CD8, den Aktivierungsmarker CD43 sowie gegen IFN γ . Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der Analysesoftware *FlowJo*. CD4⁺ bzw. CD8⁺ Lymphozyten wurden jeweils getrennt auf ihre Expression von IFN γ untersucht.

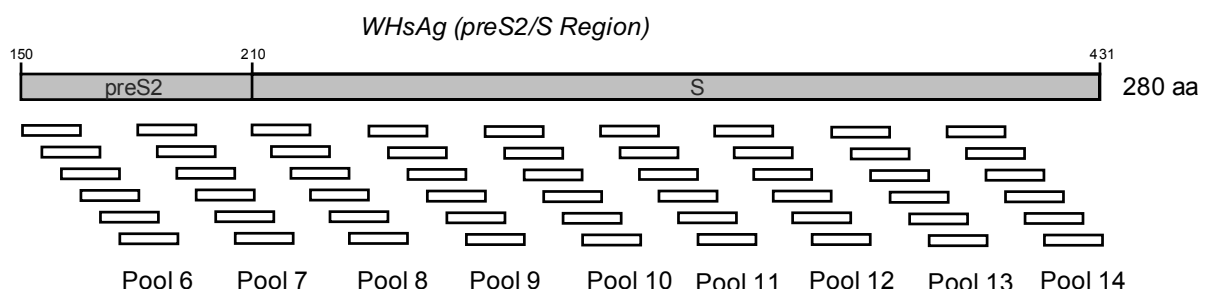


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der zur Stimulation verwendeten preS2/S-WHsAg-Peptide. Die 54 Pentadekamere überlappen um jeweils zehn Aminosäuren und decken den gesamten Bereich der preS2/S-Region des WHsAg ab (280 Aminosäuren [aa]). Das preS2-Protein beginnt in Bezug auf das gesamte WHsAg bei Aminosäure 150, das S-Protein bei Aminosäure 210. Jeweils sechs Pentadekamere wurden in insgesamt neun Pools zusammengefasst, deren Nummerierung sich auf das gesamte WHsAg bezieht und bei Pool 6 beginnt.

Insgesamt wurden die Splenozyten von acht Mäusen mit den Peptidpools, welche die preS2/S-Region des WHsAg abdecken, *in vitro* stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch auf die Expression von IFN γ analysiert.

Es zeigte sich, dass die Stimulation mit preS2/S-WHsAg-Peptidpool 12 bei CD4 $^{+}$ Zellen eine starke IFN γ -Expression ($12,4\% \pm 5,6\%$ CD4 $^{+}$ IFN γ^{+} Zellen) induzierte (Abb. 3.2A). Der Unterschied zur Stimulation mit einem vom humanen Zytomegalievirus (*engl. cytomegalovirus*, CMV) abgeleiteten Peptid (CMV-Peptid; Negativkontrolle) war nach dem Mann-Whitney-Test statistisch signifikant ($p < 0,05$). Die Stimulationen mit den Pools 8, 10 und 13 riefen jeweils eine geringere Zytokinantwort ($2,1\% \pm 0,7\%$ bis $3,1\% \pm 1,1\%$ CD4 $^{+}$ IFN γ^{+} Zellen) hervor. Im Vergleich zur Stimulation mit dem Fremdpeptid zeigte sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied.

Bei CD8 $^{+}$ Zellen wurde nach der Stimulation mit den preS2/S-WHsAg-Peptidpools 12 und 13 eine IFN γ -Expression von $4,9\% \pm 1,7\%$ bzw. $4,6\% \pm 2,2\%$ CD8 $^{+}$ IFN γ^{+} Zellen detektiert (Abb. 3.2B). Die Stimulationen mit den Pools 8, 9, 10 und 14 resultierten in einer Zytokinantwort von $1,2\% \pm 0,3\%$ bis $2,5\% \pm 1,0\%$ CD8 $^{+}$ IFN γ^{+} Zellen. Ein statistisch signifikanter Unterschied zur Stimulation mit dem Fremdpeptid lag jedoch jeweils nicht vor.

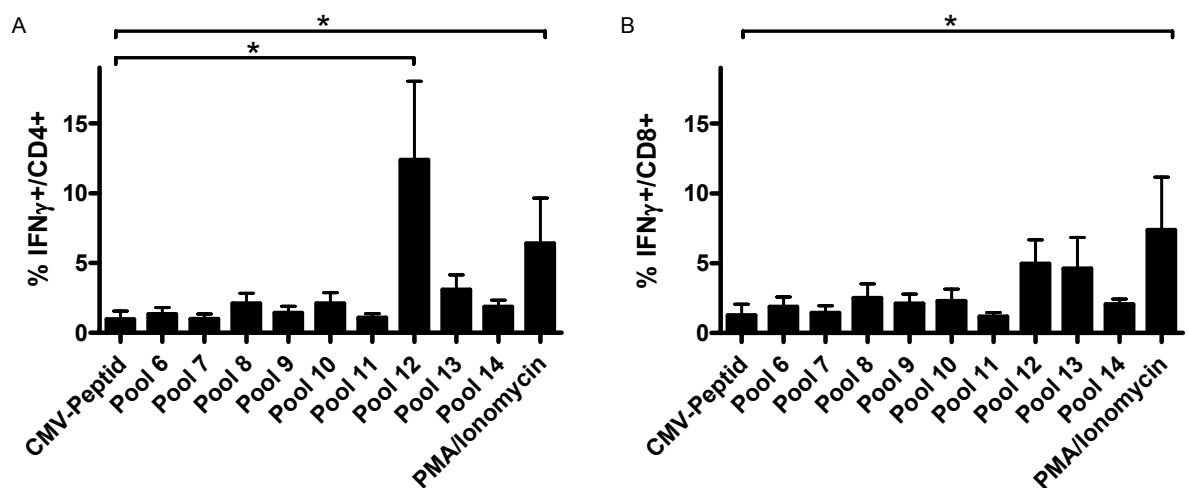


Abb. 3.2: Die IFN γ -Expression muriner T-Lymphozyten nach Stimulation mit den preS2/S-WHsAg-Peptidpools. Nach DNA-Vakzinierung wurden die Splenozyten von Mäusen für sechs Tage *in vitro* wie angegeben stimuliert und nach anschließender Restimulation für durchflusszytometrische Untersuchungen mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und IFN γ gefärbt. Die Stimulation mit dem CMV-Peptid diente als Negativkontrolle, mit PMA/Ionomycin als Positivkontrolle. Die Produktion von IFN γ wurde separat für CD4 $^{+}$ Zellen (A) und CD8 $^{+}$ Zellen (B) ausgewertet. Es sind jeweils die Mittelwerte mit Standardfehler von acht Tieren pro Gruppe dargestellt. Für die statistischen Berechnungen (*, $p < 0,05$) wurde der Mann-Whitney-Test verwendet.

Zur genaueren Charakterisierung der T-Zellsubpopulationen wurde die IFN γ -Produktion der Lymphozyten mit der Expression des murinen Aktivierungsmarkers CD43 verglichen. Zusammenfassend ließ sich die Tendenz feststellen, dass IFN γ nach der Stimulation mit Peptiden hauptsächlich durch aktivierte (CD43+) T-Zellen exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Es exprimierten jedoch auch T-Lymphozyten, welche weniger CD43 exprimierten, das untersuchte Zytokin. Die IFN γ -Produktion korrelierte nicht mit dem durch CD43 gekennzeichneten Aktivierungszustand der T-Lymphozyten.

Abbildung 3.3 (Seite 57) zeigt exemplarisch die IFN γ -Expression von CD4+ Zellen durch Stimulation mit den preS2/S-WHsAg-Peptidpools. Die Peptide der Pools 12 und 13 induzierten insgesamt eine starke Zytokinantwort (43,1% bzw. 8,3% CD4+IFN γ +), die Peptide der Pools 8 und 10 eine schwache Expression von IFN γ (2,7% bzw. 3,8% CD4+IFN γ +).

In Abbildung 3.4 (Seite 58) ist die IFN γ -Expression von CD8+ Lymphozyten nach Peptidstimulation in Bezug auf CD43 exemplarisch dargestellt. Hier wurde durch die Peptide des preS2/S-WHsAg-Pools 13 eine starke IFN γ -Expression bei allen CD8+ Zellen induziert (19,3% CD8+IFN γ +). Die Stimulation mit Peptiden der Pools 7, 8, 9, 12 und 14 resultierte in einer schwachen bis mittleren Zytokinantwort (1,9% bis 12,7% CD8+IFN γ +).

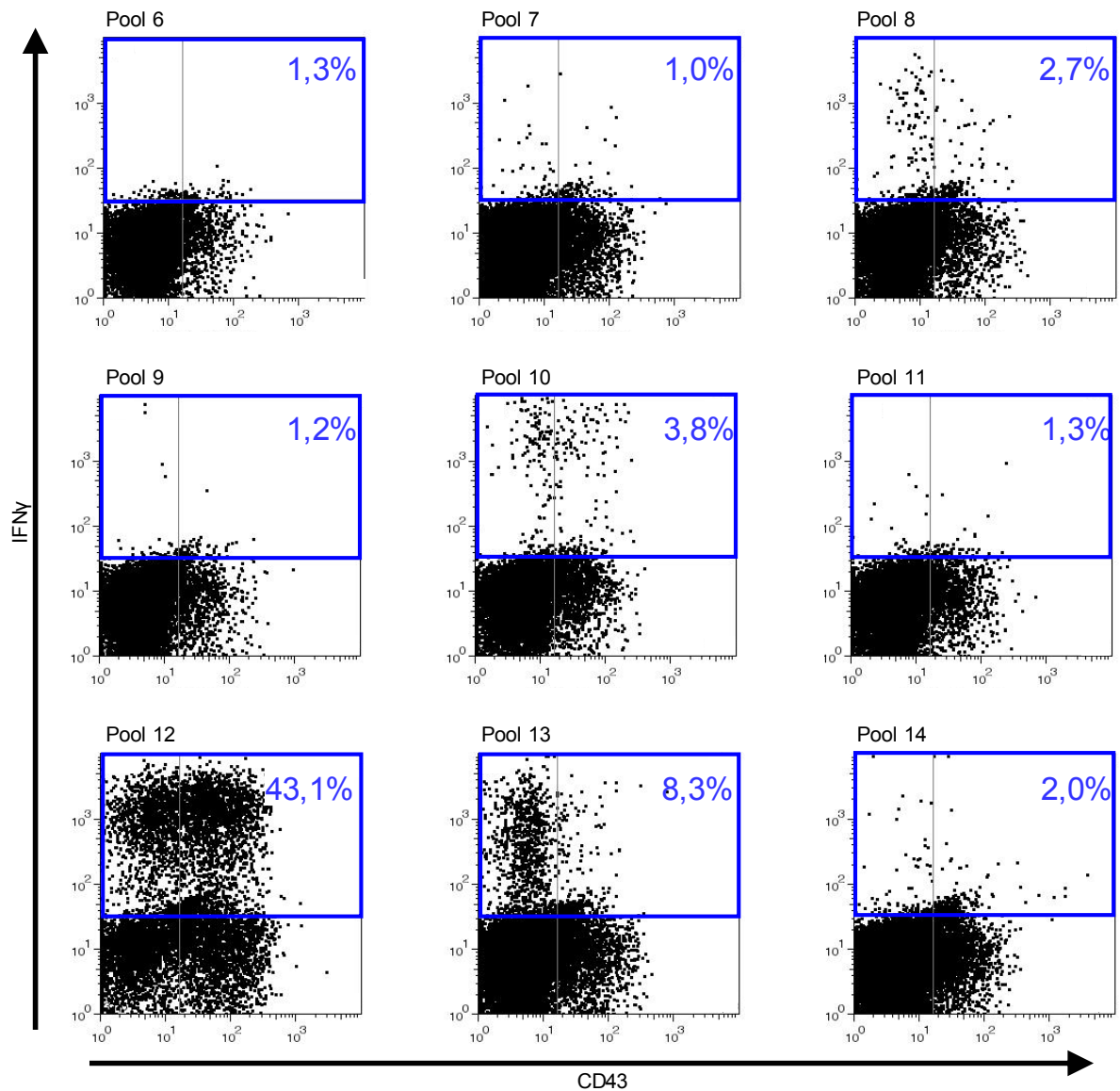


Abb. 3.3: Exemplarische Darstellung der IFN γ -Expression muriner CD4+ Zellen nach Stimulation mit preS2/S-WHsAg-Peptidpools. Murine Splenozyten wurden wie angegeben *in vitro* für sechs Tage stimuliert und nach anschließender Restimulation für durchflusszytometrische Untersuchungen mit Antikörpern gegen CD4, CD8, CD43 und IFN γ gefärbt. Für die hier dargestellten Diagramme wurden die CD4+ Zellen ausgewählt und auf ihre Expression von IFN γ und CD43 untersucht.

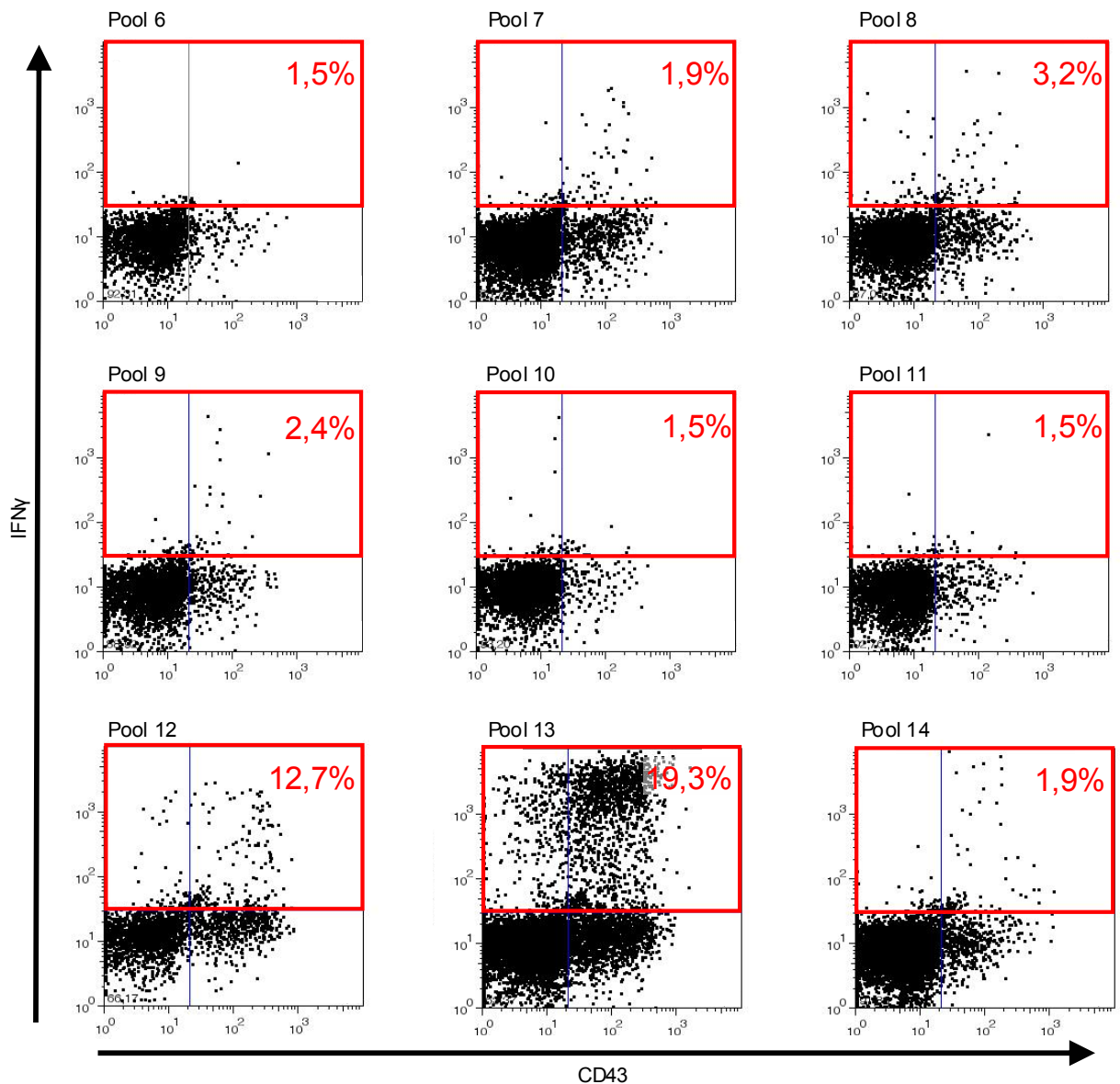


Abb. 3.4: Exemplarische Darstellung der IFN γ -Expression muriner CD8+ Zellen nach Stimulation mit preS2/S-WHsAg-Peptidpools. Murine Splenozyten wurden wie angegeben *in vitro* für sechs Tage stimuliert und nach anschließender Restimulation für durchflusszytometrische Untersuchungen mit Antikörpern gegen CD4, CD8, CD43 und IFN γ gefärbt. Für die hier dargestellten Diagramme wurden die CD8+ Zellen ausgewählt und auf ihre Expression von IFN γ und CD43 untersucht.

Ziel der weiteren Versuche war die genauere Bestimmung der Epitope. Dazu wurden die Splenozyten von acht Mäusen zunächst mit den Einzelpeptiden desjenigen Pools stimuliert, welcher die stärkste Zytokinantwort induziert hatte. Zur Anwendung kamen hierbei die Peptide s330-344 bis s355-369 des Pools 12, welche den Bereich von Aminosäure 330 bis 369 des WHsAg abdecken (Abb. 3.5).

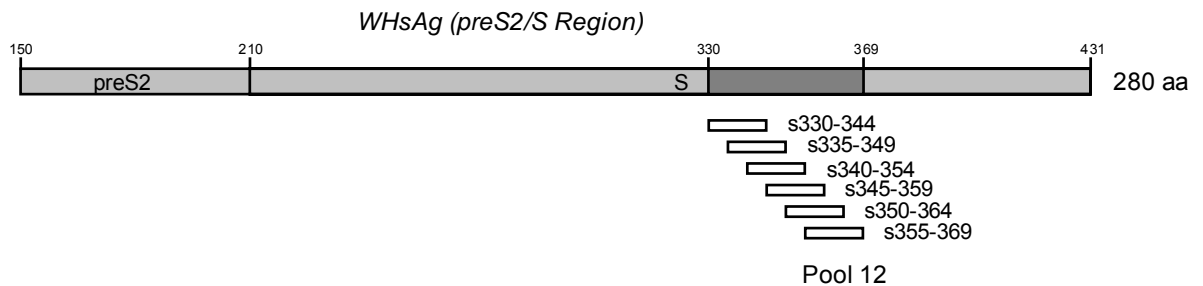


Abb. 3.5: Lokalisation des Peptidpools 12 des preS2/S-WHsAg. Das WHV preS2-Protein beginnt bezogen auf das gesamte WHsAg bei Aminosäure 150, das S-Protein bei Aminosäure 210. Die Peptide s330-344 bis s355-369 des Pools 12 sind im Bereich der Aminosäuren 330 bis 369 des WHsAg lokalisiert.

Bei diesen Untersuchungen wurden die zwei benachbarten Peptide s345-359 und s350-364 als diejenigen Peptide des preS2/S-WHsAg-Pools 12 identifiziert, welche bei der Gesamtpopulation der CD4+ Zellen eine starke IFN γ -Expression ($1,3\% \pm 0,5\%$ bzw. $1,7\% \pm 0,8\%$ CD4+IFN γ + Zellen) hervorriefen (Abb. 3.6A, Seite 60). Der Unterschied zu der Stimulation mit dem Fremdpeptid war für das Peptid s345-359 statistisch signifikant ($p < 0,05$). Abbildung 3.7 (Seite 60) zeigt exemplarisch eine durch diese Peptide induzierte IFN γ -Expression von 4,2% bzw. 6,9% im Vergleich zu 0,4% bis 1,0% bei den Peptiden s330-344 bis s340-354 und s355-369.

Die Identifikation eines IFN γ -induzierenden Einzelpeptides für CD8+ Zellen war nicht möglich (Abb. 3.6B), da für keine Stimulation ein statistisch signifikanter Unterschied zu der Stimulation mit dem Fremdpeptid vorlag.

Zusammenfassend wurden in diesem Teil der Arbeit, ähnlich wie bei HBV, T-Zellepitope im Hüllprotein von WHV im Maussystem nachgewiesen.

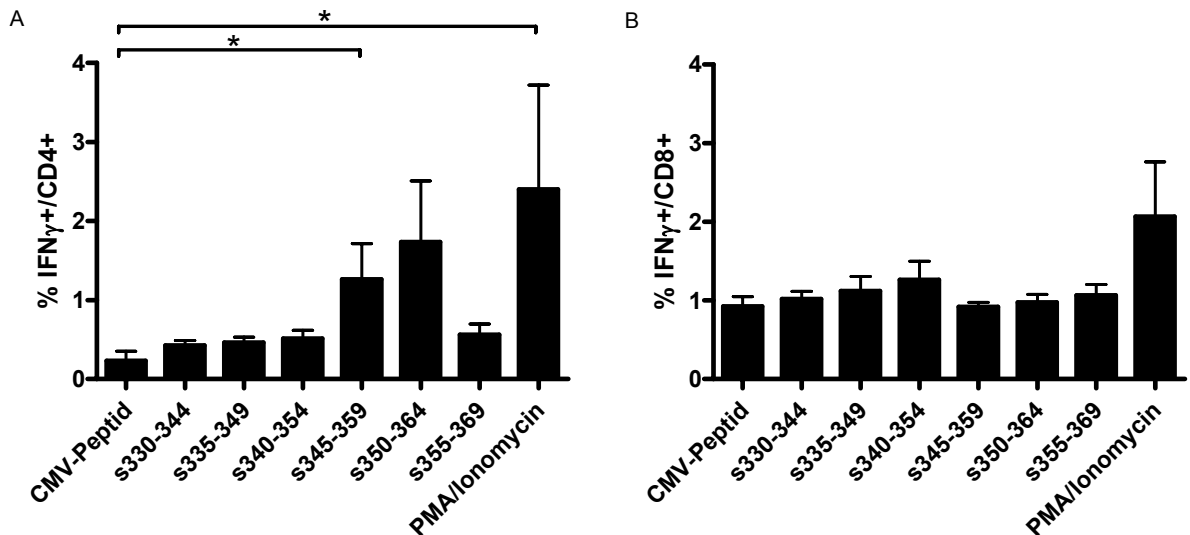


Abb. 3.6: Die IFN γ -Expression muriner T-Lymphozyten nach Stimulation mit den Einzelpeptiden des preS2/S-WHsAg-Peptidpools 12. Nach DNA-Vakzinierung wurden die Splenozyten von Mäusen für sechs Tage *in vitro* wie angegeben stimuliert und nach anschließender Restimulation für durchflusszytometrische Untersuchungen mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und IFN γ gefärbt. Die Stimulation mit dem CMV-Peptid diene als Negativkontrolle und mit PMA/Ionomycin als Positivkontrolle. Die Produktion von IFN γ wurde separat für CD4+ Zellen (A) und CD8+ Zellen (B) ausgewertet. Es sind jeweils die Mittelwerte mit Standardfehler von acht Tieren pro Gruppe dargestellt. Für die statistischen Berechnungen (*, $p < 0,05$) wurde der Mann-Whitney-Test zugrunde gelegt.

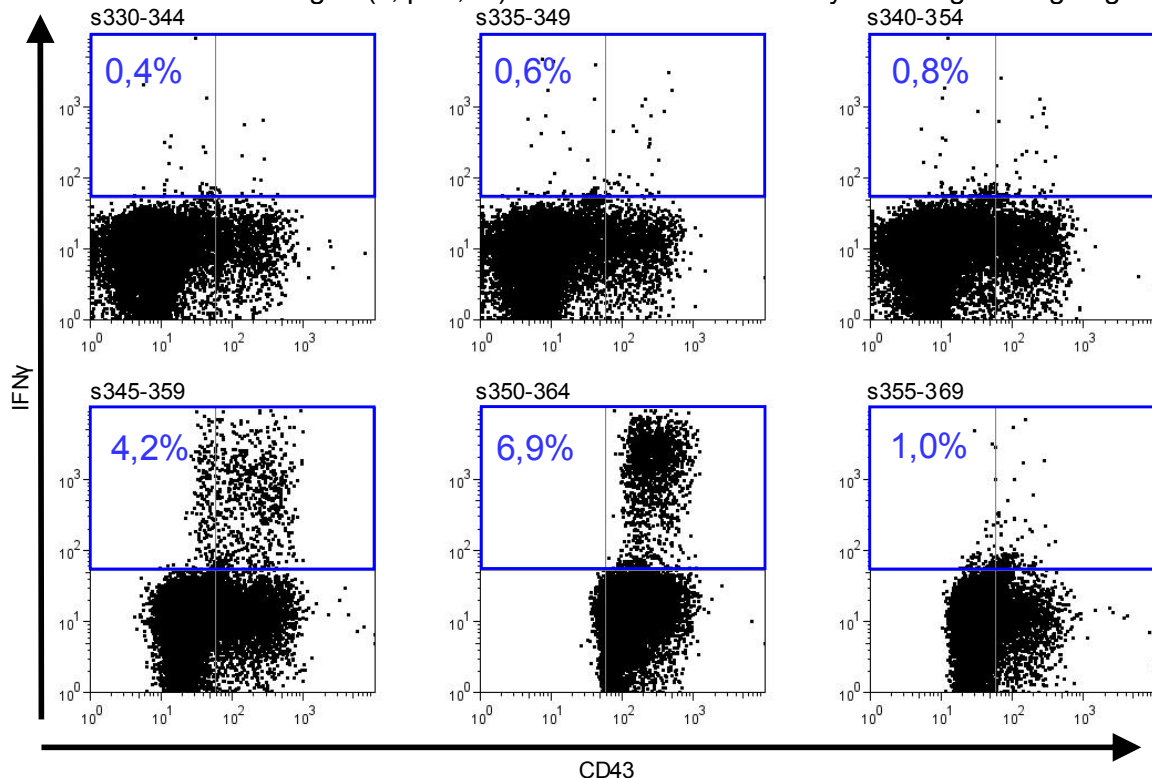


Abb. 3.7: Exemplarische Darstellung der IFN γ -Expression muriner CD4+ Zellen nach Stimulation mit den Einzelpeptiden des preS2/S-WHsAg-Peptidpools 12. Murine Splenozyten wurden wie angegeben *in vitro* für sechs Tage stimuliert und nach anschließender Restimulation für durchflusszytometrische Untersuchungen mit Antikörpern gegen CD4, CD8, CD43 und IFN γ gefärbt. Für die hier dargestellten Diagramme wurden die CD4+ Zellen ausgewählt und auf ihre Expression von IFN γ und CD43 untersucht.

3.2 Klonierung der Woodchuck-CD107a-DNA-Sequenz

Nachdem spezifische T-Lymphozyten gegen das Hüllprotein von WHV im Maussystem nachgewiesen und die entsprechenden Methoden optimiert wurden, sollten WHV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (*engl. cytotoxic T lymphocytes*, CTL) im Woodchuck-Modell nachgewiesen werden. Dazu wurde eine durch die Arbeitsgruppe von Betts entwickelte Methode verwendet, welche die zytolytische Effektorfunktion virusspezifischer CTL direkt detektiert (Betts et al., 2003). Sie basiert auf der durchflusszytometrischen Detektion des degranulationsassoziierten Glykoproteins CD107a auf der T-Zelloberfläche. Grundlegende Voraussetzung für die Anwendung dieser Technik im Woodchuck-Modell war zunächst die Identifizierung eines geeigneten kreuzreaktiven Antikörpers gegen das Woodchuck-CD107a-Protein. Daher stellte sich die Frage, wie groß die Ähnlichkeit dieses Proteins zu dem anderer Spezies ist. Die DNA-Sequenz des Woodchuck-CD107a-Moleküls wurde kloniert, um diese Frage zu beantworten.

Dazu wurde eine cDNA-Bibliothek, die aus RNA von peripheren Blutlymphozyten (*engl. peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) der Marmosetter hergestellt worden war, als Matrize in einer Touchdown-PCR eingesetzt. Die Primer wurden anhand der Nukleotidsequenzen des humanen bzw. des murinen CD107a konstruiert und in verschiedenen Kombinationen eingesetzt. Die Lokalisation der verwendeten Primer 1s, 2as, 3as, 4s, 5as, 6as und 7as ist in Abbildung 3.8 schematisch und in Tabelle 3.1 in Bezug auf die humane CD107a-Sequenz mit einer Länge von 2560 Nukleotiden (nt) dargestellt.

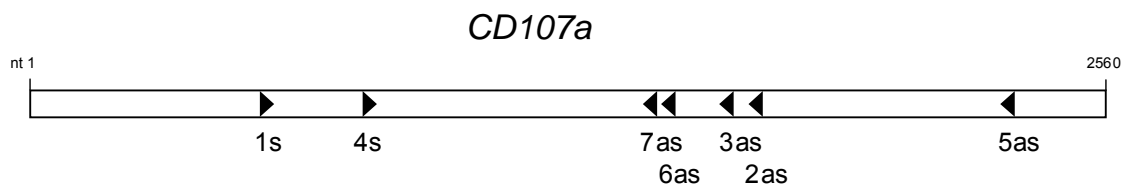


Abb. 3.8: Schematische Darstellung der Lokalisation der verwendeten Primer. Die Primer sind gemäß ihrer Orientierung als Pfeilspitzen dargestellt. Die Nummerierung der Nukleotide (nt) bezieht sich auf die mRNA-Sequenz des humanen CD107a-Moleküls.

Tab. 3.1: Lokalisation der zur Klonierung verwendeten Primer sowie die in einer PCR zu erwartende Fragmentgröße unterschiedlicher Primerkombinationen in Bezug auf die humane CD107a-Sequenz (2560 nt)

Primer	Lokalisation (nt)	zu erwartende Fragmentgröße (in nt) in Kombination mit dem sense-Primer	
		1s	4s
1s	555-575	-	-
2as	1703-1723	1168	923
3as	1653-1673	1118	873
4s	800-818	-	-
5as	2320-2339	1784	1539
6as	1498-1517	962	717
7as	1469-1488	933	688

Abbildung 3.9 zeigt exemplarisch die gelelektrophoretische Auftrennung von Klonierungs-PCR-Produkten unter Verwendung der Primer 1s, 2as, 4s, 5as und 6as in unterschiedlichen Kombinationen.

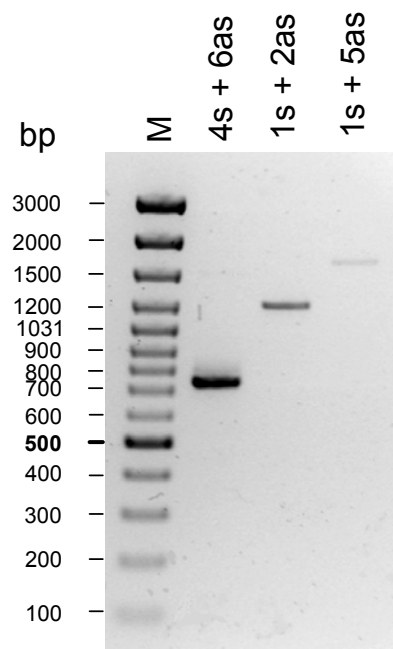


Abb. 3.9: Exemplarische Darstellung der gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten einer Klonierungs-PCR der Woodchuck-CD107a-DNA-Sequenz. Die Primer 1s, 2as, 4s, 5as und 6as wurden wie angegeben in verschiedenen Kombinationen eingesetzt. Als Größenstandard wurde eine 100 bp-DNA-Leiter (M) verwendet.

Die elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Amplifikate wurden aus dem Gel extrahiert und mit Hilfe des TOPO™ TA Cloning® Kits in *E.coli* (Stamm TOP10 One Shot™) kloniert. Pro Primerkombination wurden mindestens drei Klone für die Sequenzierung ausgewählt und ausgewertet.

Die Analyse der eingebrachten Sequenzen verschiedener Länge und Lokalisation resultierte in einem Gesamtfragment mit einer Länge von 1559 Nukleotiden (vgl. Anhang S.103ff.). Verglichen mit der humanen und der murinen CD107a mRNA-Sequenz kodieren die ersten 970 bp dieses Fragmentes für das Membranprotein. Datenbankanalysen ergaben, dass dieser potenziell kodierende Bereich große Ähnlichkeiten mit CD107a mRNA-Sequenzen verschiedener Spezies aufweist. Mit Hilfe der Auswertesoftware VectorNTI® wurde die Homologie der Woodchuck-CD107a-Nukleotidsequenz zu den entsprechenden Sequenzen von Maus (*Mus musculus*), Mensch (*Homo sapiens*) und Javaneraffe (*Macaca fascicularis*) mit 75%, 81% bzw. 82% bestimmt. Auf Proteinebene lagen die Homologien bei 68%, 78% bzw. 79%. Ein Alignment der jeweiligen Sequenzen ist im Anhang beigefügt.

Die nicht-kodierenden 589 Nukleotide des klonierten Woodchuck-CD107a-Fragmentes weisen ebenfalls Ähnlichkeiten von etwa 80% zu den entsprechenden Sequenzen anderer Spezies auf.

Die ermittelten Homologien ließen eine Kreuzreaktivität kommerziell erhältlicher, monoklonaler anti-CD107a-Antikörper vermuten. In Vorversuchen mit peptidstimulierten Woodchuck-Splenozyten wurden daher zwei monoklonale Antikörper gegen das humane und ein Antikörper gegen das murine CD107a-Protein getestet. Der anti-Maus CD107a-Antikörper zeigte eine spezifische Bindung zu den Woodchuck-Lymphozyten (Daten nicht gezeigt) und wurde deshalb in den folgenden Experimenten verwendet.

3.3 Nachweis WHcAg-spezifischer T-Zellen in der Milz von Murmeltieren mit ausgeheilter WHV-Infektion

Nach einer ausgeheilten Virusinfektion persistieren virusspezifische Gedächtnis-T-Zellen unter anderem in der Milz. Für den Nachweis virusspezifischer CTL nach einer akuten Infektion werden im Mausmodell meist Splenozyten verwendet. In diesem Versuchsteil wurden daher zur Etablierung der Technik Splenozyten von Murmeltieren mit ausgeheilter WHV-Infektion verwendet.

Die Zellen wurden aus Milzgewebe isoliert, welches durch partielle Splenektomien 18 Monate nach Infektion genommen worden war, und anschließend *in vitro* mit sechs Pools von je sechs Peptiden stimuliert. Die Pentadekamere decken das gesamte WHcAg ab (Abb. 3.10). Nach einer Restimulation am sechsten Tag erfolgte die Färbung mittels Antikörpern gegen den T-Zellmarker CD3 sowie gegen den Degranulationsmarker CD107a. Eine genauere Phänotypisierung zytotoxischer T-Zellen, welche durch die Expression von CD8 gekennzeichnet sind, war aufgrund eines fehlenden spezifischen Antikörpers gegen CD8 nicht möglich. Als Kontrollen blieben Zellen entweder unstimuliert, wurden nach sechs Tagen *in vitro*-Stimulation nicht mit dem entsprechenden Peptidpool restimuliert oder wurden mit einem Fremdpeptid (CMV-Peptid) stimuliert.

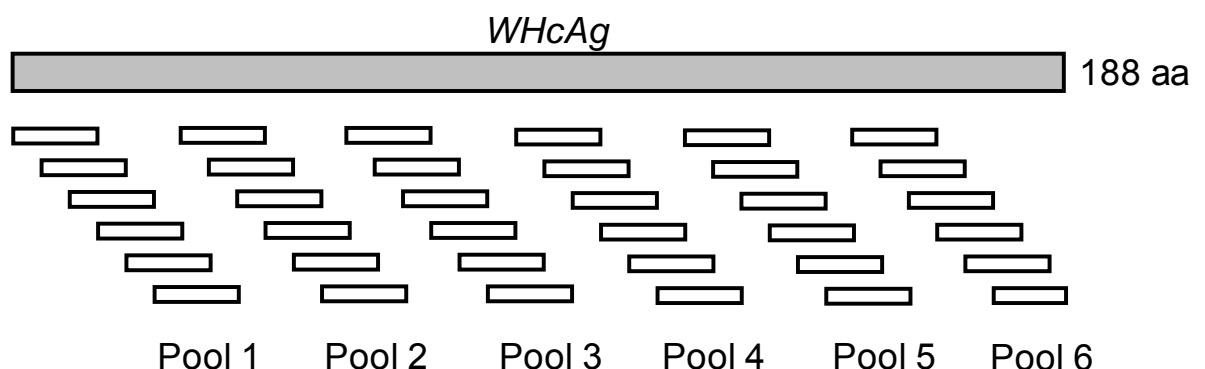


Abb. 3.10: Schematische Darstellung der zur Stimulation verwendeten WHcAg-Peptide. Die 36 Pentadekamere decken den gesamten Bereich des WHcAg (188 Aminosäuren [aa]) ab und überlappen um jeweils zehn Aminosäuren. Jeweils sechs Peptide wurden in insgesamt sechs Pools zusammengefasst.

Zur Auswertung der Daten wurden Zellen, welche aufgrund ihrer Eigenschaften im FSC/SSC-Diagramm als Lymphozyten charakterisiert worden waren, auf ihre Expression von CD107a nach der Stimulation mit unterschiedlichen WHcAg-Peptidpools untersucht.

Abbildung 3.11 zeigt exemplarisch die Expression von CD107a auf stimulierten Lymphozyten eines Tieres mit ausgeheilter WHV-Infektion. Bei den Kontrollen lag eine Hintergrundfärbung von 0,4% bis 0,6% CD107a+ T-Zellen aller eingegrenzten Lymphozyten vor, wie in Teil A der Abbildung dargestellt ist. Die Stimulation der Zellen mit den WHcAg-Peptidpools 1, 2, 3, 5 und 6 resultierte in 0,4% bis 0,6% CD107a+ T-Zellen (Teil B). Der Prozentsatz an CD107a+ T-Lymphozyten lag bei Zellen, welche mit WHcAg-Peptidpool 4 stimuliert worden waren, mit 2,9% deutlich höher.

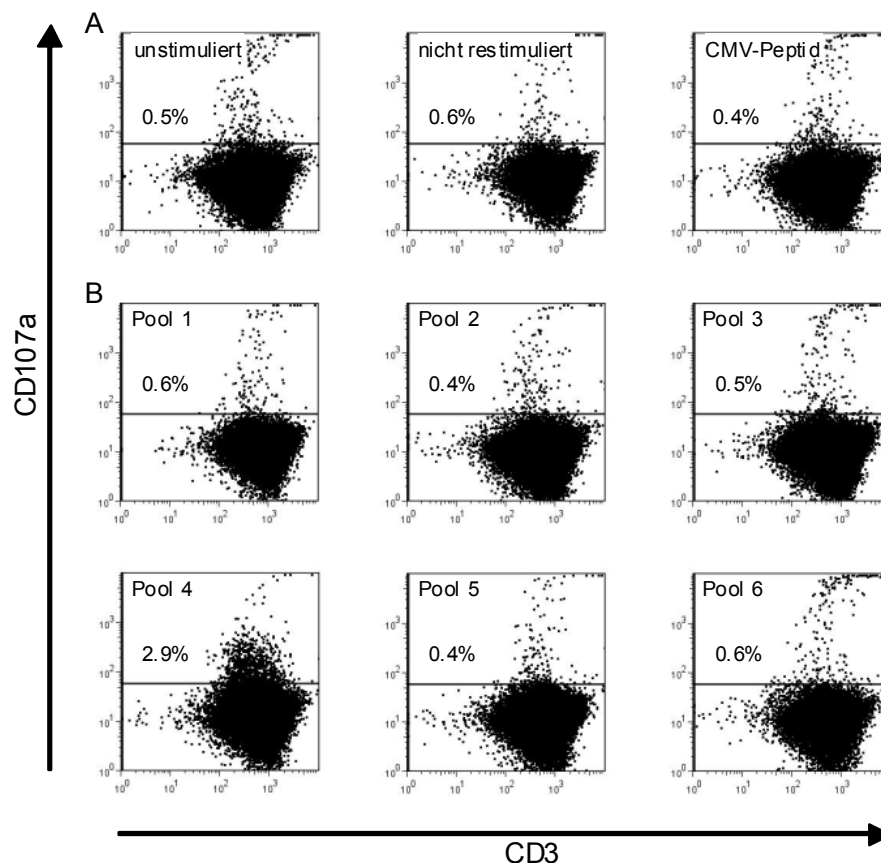


Abb. 3.11: Exemplarische Darstellung der CD107a-Expression stimulierter Splenozyten eines Murmeltiers mit ausgeheilter WHV-Infektion. Die Splenozyten wurden isoliert, *in vitro* für sechs Tage wie angegeben stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch auf ihre Expression von CD107a analysiert. Teil A zeigt die Kontrollen, Teil B die Stimulation der Milzzellen mit den WHcAg-Peptidpools 1 bis 6. Die Prozentzahlen geben den Anteil CD107a+ T-Lymphozyten an den eingegrenzten Zellen an.

Insgesamt wurden die Splenozyten von sechs Murmeltieren (15810, 17214, 21026, 21027, 21029, 21032) mit ausgeheilter WHV-Infektion mittels des CD107a-Degranulationstests auf ihre Expression von CD107a untersucht. Bei den Kontrollen und den Stimulationen mit den WHcAg-Peptidpools 1, 2, 3, 5 und 6 lag der Anteil CD107a+ T-Zellen an den eingegrenzten Lymphozyten bei allen Tieren zwischen 0,1% und 0,8%. Nach der Stimulation mit Peptidpool 4 zeigten sechs von sechs Tieren erhöhte CD107a-Antworten mit Werten zwischen 0,8% und 2,9% CD107a+ T-Zellen (Abb. 3.12). Der Unterschied zu den Kontrollstimulationen war nach dem Mann-Whitney-Test jeweils statistisch signifikant ($p < 0,01$).

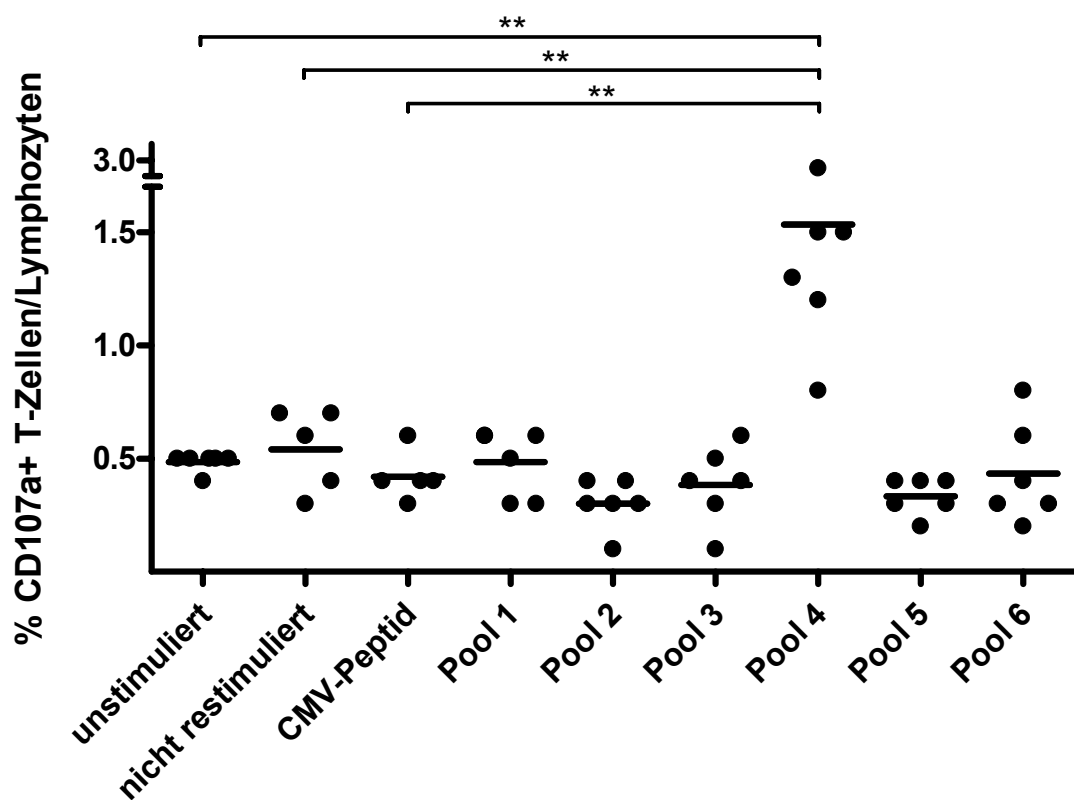


Abb. 3.12: Anteil CD107a-positiver T-Zellen an den eingegrenzten Zellen nach Peptidstimulation bei sechs Murmeltieren mit ausgeheilter WHV-Infektion. Die Splenozyten von sechs immunen Murmeltieren wurden isoliert, *in vitro* für sechs Tage wie angegeben stimuliert und anschließend der Anteil CD107a+ T-Zellen an den eingegrenzten Zellen bestimmt. Jeder Punkt symbolisiert ein individuelles Tier. Die Querstriche zeigen den Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Der Unterschied zwischen den Kontrollen und der Stimulation mit Peptidpool 4 war nach dem Mann-Whitney-Test jeweils statistisch signifikant ($p < 0,01$).

In diesem Versuchsteil wurde der CD107a-Degranulationstest zum Nachweis virusspezifischer CTL im Woodchuck-Modell etabliert. Bei sechs immunen Tieren wurde damit eine Reaktion auf den WHcAg-spezifischen Peptidpool 4 festgestellt.

3.4 Analyse von Splenozyten naiver Murmeltiere unter Verwendung des CD107a-Degranulationstests

Splenozyten WHV-negativer Tiere wurden mit dem CD107a-Degranulationstest untersucht, um auszuschließen, dass die Stimulation mit den viralen Peptiden eine unspezifische Antwort hervorruft. Daher wurden Splenozyten von naiven Tieren isoliert, für sechs Tage *in vitro* mit den WHcAg-Peptidpools stimuliert und durchflusszytometrisch auf ihre Expression von CD107a analysiert.

Die Auswertung der Daten von zwei Kontrolltieren (30341, 30342) ergab, dass nach der Peptidstimulation keine CD107a+ T-Zellen nachweisbar waren. Abbildung 3.13 zeigt exemplarisch, dass der Anteil CD107a+ T-Zellen an den eingegrenzten Lymphozyten sowohl bei den Kontrollen (Teil A) als auch bei den mit WHcAg-Peptiden stimulierten Ansätzen (Teil B) mit Werten zwischen 0,3% und 0,4% im Bereich der Hintergrundfärbung lag.

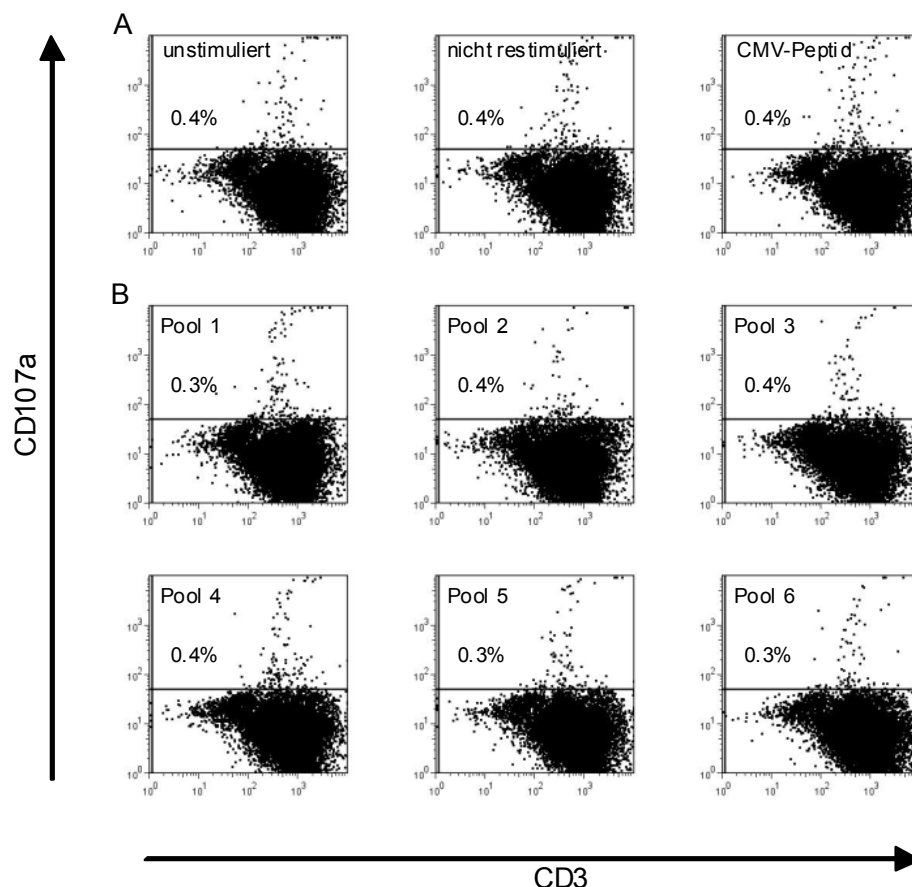


Abb. 3.13: Exemplarische Darstellung der CD107a-Expression stimulierter Splenozyten eines naiven Murmeltiers. Die Splenozyten wurden isoliert, *in vitro* für sechs Tage wie angegeben stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch auf ihre Expression von CD107a analysiert. Teil A zeigt die Kontrollen, Teil B die Stimulation der Milzzellen mit den WHcAg-Peptidpools 1 bis 6. Die Prozentzahlen geben den Anteil CD107a+ T-Lymphozyten an den eingegrenzten Zellen an.

3.5 Nachweis WHcAg-spezifischer T-Zellen in Lymphknoten von Marmosetieren mit ausgeheilter WHV-Infektion

Da neben der Milz auch Lymphknoten zu den lymphatischen Organen zählen und virusspezifische CTL enthalten, sollten Lymphozyten aus diesem Gewebe mit dem neu etablierten CD107a-Degranulationstest untersucht werden. Dazu wurden Zellen aus mesenterialen Lymphknoten von immunen Marmosetieren isoliert.

Analog zum Stimulationsprotokoll von Splenozyten wurden die Lymphknotenzellen nach Isolation für sechs Tage *in vitro* mit den WHcAg-Peptidpools stimuliert. Im Anschluss an die Restimulation erfolgte die Färbung mit Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD107a und die durchflusszytometrische Analyse.

Innerhalb der im FSC/SSC-Diagramm als Lymphozyten charakterisierten Zellpopulation wurden CD107a⁺ T-Zellen nach der Stimulation mit WHcAg-Peptidpool 4 nachgewiesen. Abbildung 3.14 zeigt exemplarisch einen Anteil von 0,7% CD107a⁺ T-Zellen nach Stimulation mit Pool 4 im Vergleich zu 0,1% CD107a⁺ T-Zellen bei der unstimulierten Kontrolle.

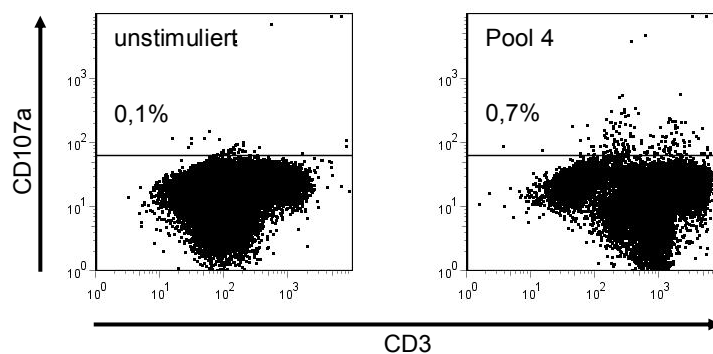


Abb. 3.14: Exemplarische Darstellung der CD107a-Expression stimulierter Zellen aus dem Lymphknoten eines Marmosetiers mit ausgeheilte WHV-Infektion. Die Zellen wurden isoliert, *in vitro* für sechs Tage wie angegeben stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch auf ihre Expression von CD107a analysiert. Die Prozentzahlen geben den Anteil CD107a⁺ T-Lymphozyten an den eingegrenzten Zellen an.

3.6 Kartierung eines WHcAg-Epitopes

Zur Identifikation der für die Degranulation verantwortlichen Epitope wurden Splenozyten mit den Einzelpeptiden des WHcAg-Peptidpools 4 stimuliert (*engl.* epitope mapping). Da es sich bei Murmeltieren nicht um Tiere mit dem gleichen definierten genetischen Hintergrund handelt – es gibt keine Woodchuck-Inzuchtstämme –, wurde die Kartierung von Epitopen mit Splenozyten von Tieren durchgeführt werden, welche zuvor positiv auf die Stimulation mit Peptidpool 4 reagiert hatten. So wurde garantiert, dass zur Epitoperkennung dieselben MHC (*engl. major histocompatibility complex*)-Allele wie in den vorangegangenen Experimenten vorlagen.

Für diesen Versuchsteil wurden drei der sechs zuvor getesteten Tiere verwendet, welche mit Pool 4 eine erhöhte Expression von CD107a gezeigt hatten. Zur Isolation der autologen Splenozyten wurden Milzbiopsien mittels serieller Splenektomien entnommen.

Die zur Stimulation verwendeten Einzelpeptide c91-105 bis c116-130 aus Pool 4 decken den Bereich von Aminosäure 91 bis 130 des WHsAg ab (Abb. 3.15).

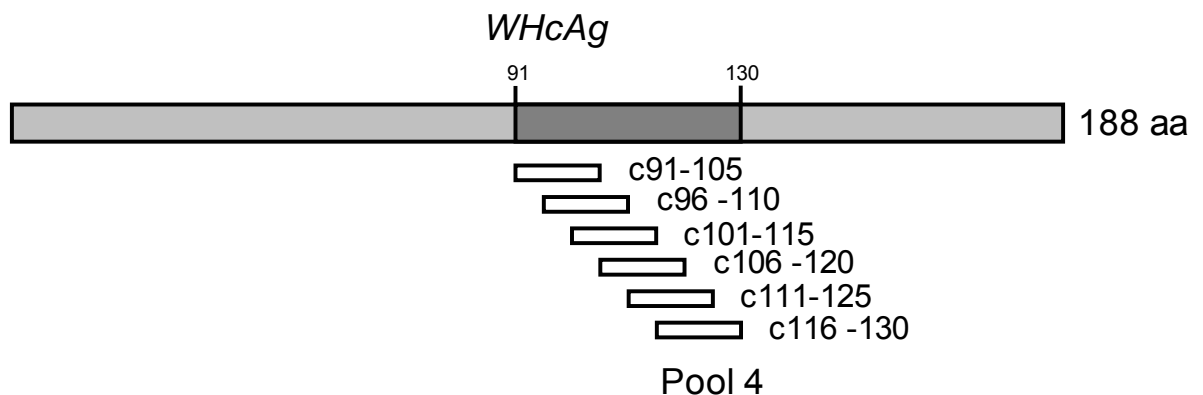


Abb. 3.15: Lokalisation des WHcAg-Peptidpools 4. Die Peptide c91-105 bis c116-130 des Pools 4 sind im Bereich von Aminosäure 91 bis 130 des WHcAg lokalisiert.

Splenozyten von zwei der drei analysierten Tiere zeigten im CD107a-Degranulationstest eine Antwort auf das Peptid c96-110 (2,3% bzw. 4,6% CD107a+ T-Zellen), das dritte Tier reagierte nicht auf diese Stimulation (0,5% CD107a+ T-Zellen). Die Stimulation mit den Peptiden c91-105 und c101-115 bis c116-130 resultierte jeweils in 0,3% bis 0,5% CD107a+ T-Zellen, wie in Abbildung 3.16 exemplarisch dargestellt ist.

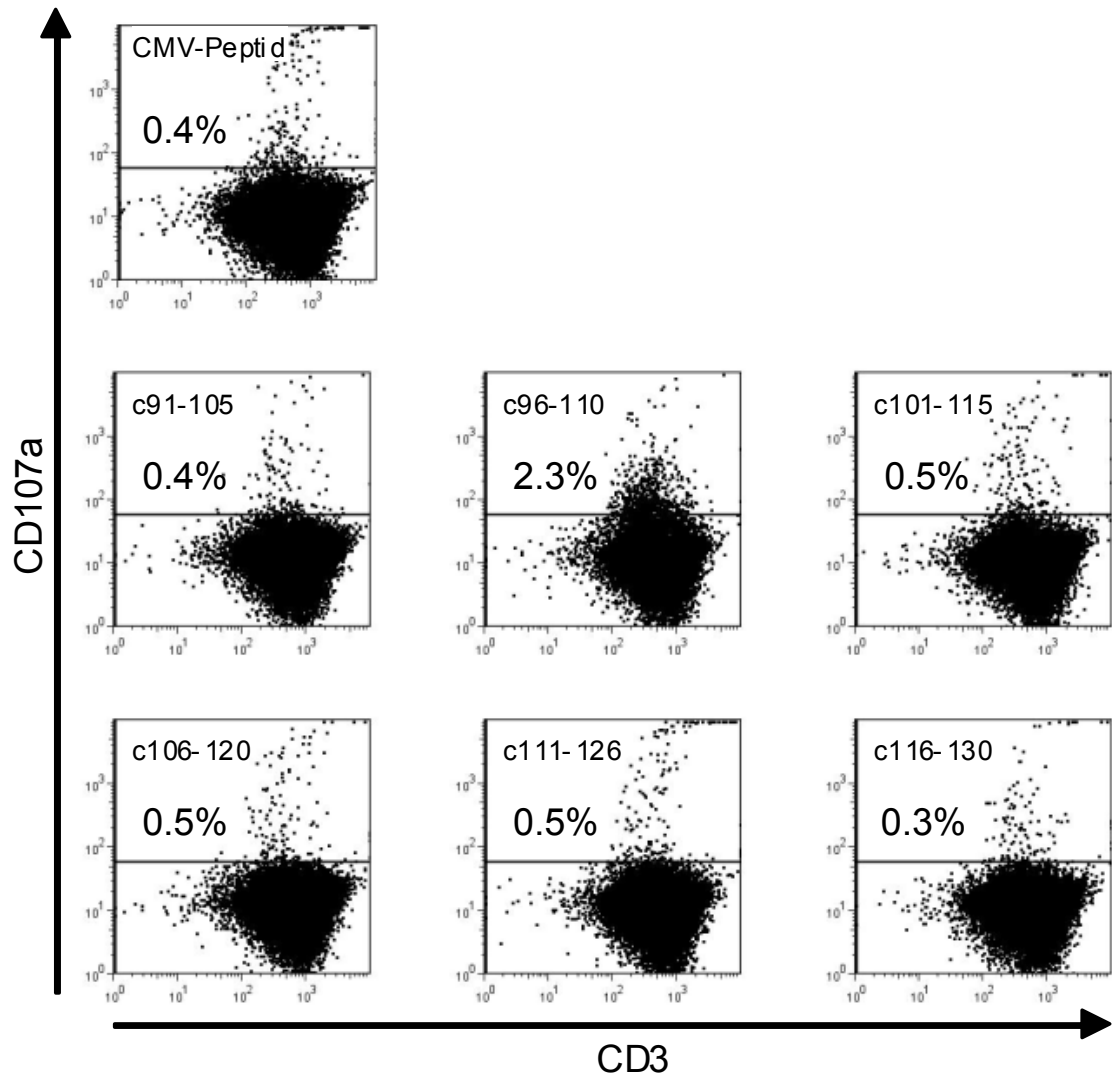


Abb. 3.16: Exemplarische Darstellung der CD107a-Expression von Splenozyten nach Stimulation mit den Einzelpeptiden des WHcAg-Peptidpools 4. Die Splenozyten eines immunen Tieres wurden isoliert, *in vitro* für sechs Tage wie angegeben stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch auf ihre Expression von CD107a analysiert. Die Prozentzahlen geben den Anteil CD107a+ T-Lymphozyten an den eingegrenzten Zellen an. Die Stimulation mit einem Fremdpeptid (CMV-Peptid) diente als Negativkontrolle.

3.7 Phänotypische Charakterisierung der WHcAg-spezifischen T-Lymphozyten

In verschiedenen Veröffentlichungen wurde die Expression des Degranulationsmarkers CD107a für die Population der CD8⁺ T-Lymphozyten gezeigt (Rubio et al., 2003; Zelinskyy et al., 2005). Daher sollten die zuvor identifizierten WHcAg-spezifischen T-Lymphozyten mittels durchflusszytometrischer Analysen genauer charakterisiert werden. Eine Färbung mit Antikörpern gegen die T-Zellmarker CD3 und CD4 erlaubte diese Phänotypisierung trotz des Fehlens eines spezifischen Antikörpers gegen CD8. Zur Auswertung der Daten wurde die Zellpopulation, welche aufgrund ihrer Eigenschaften im FSC/SSC-Diagramm als Lymphozytenpopulation charakterisiert worden war, auf die Expression der T-Zell-spezifischen Moleküle CD3 und CD4 analysiert (Abb. 3.17A). In der weiteren Auswertung erwies sich die Population der CD3⁺CD4⁻ Zellen als diejenige, welche nach Stimulation mit dem WHcAg-Peptid c96-110 den Degranulationsmarker CD107a auf der Zelloberfläche präsentiert (Abb. 3.17B).

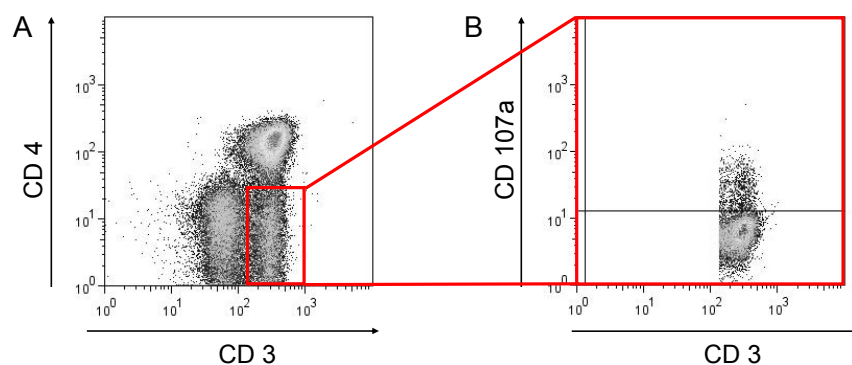


Abb. 3.17: Phänotypische Charakterisierung der WHV-spezifischen T-Lymphozyten. Splenozyten eines Murmeltieres mit ausgeheilter WHV-Infektion wurden nach Stimulation mit dem WHcAg-Peptid c96-110 mittels des CD107a-Degranulationstests analysiert. (A) Die anhand des FSC/SSC-Diagramms ausgewählte Lymphozytenpopulation wurde mittels der Färbung mit Antikörpern gegen die T-Zell-spezifischen Moleküle CD3 und CD4 genauer charakterisiert. (B) Die CD3⁺CD4⁻ Zellpopulation (roter Kasten) zeigte eine Expression von CD107a auf der Zelloberfläche.

3.8 Charakterisierung der WHcAg-spezifischen T-Zellantwort in der akuten Phase einer WHV-Infektion

Aus Experimenten an HBV-infizierten Schimpansen und Studien mit HBV-infizierten Patienten ist bekannt, dass virusspezifische CTL relativ spät nach Infektion im Vergleich zu anderen Virusinfektionen detektierbar sind (Webster et al., 2000; Thimme et al., 2003). Daher sollte nach der Etablierung des CD107a-Degranulationstests die Kinetik der virusspezifischen CTL-Antwort in der akuten Phase einer WHV-Infektion charakterisiert werden.

Zu diesem Zweck war eine Optimierung des Stimulationsprotokolls für periphere Blutlymphozyten (PBMC) erforderlich. Diese wurde erreicht, indem die Dauer der *in vitro*-Stimulation mit Peptiden von sechs auf zwei Tage reduziert wurde. Dadurch wurde der Anteil vitaler Zellen in der Zellpräparation erhöht und infolgedessen eine Verbesserung der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse erzielt (Daten nicht gezeigt).

Zur Bestimmung der T-Zellkinetik wurden zwei WHV-negative Murmeltiere (22524 und 22531) intravenös mit WHV infiziert und ab Woche 2 nach Infektion (*post infectionem*, p.i.) wöchentlich hinsichtlich verschiedener Infektionsparameter untersucht. Auf die Erhebung von Messwerten zur zellulären Immunantwort in den ersten vier Wochen wurde verzichtet, da aufgrund von Studien mit Menschen und Schimpansen keine zelluläre Immunantwort gegen virale Antigene in dieser Zeit zu erwarten war (Webster et al., 2000; Thimme et al., 2003).

Bei Tier 22524 war die WHV-DNA von Woche 2 bis 7 p.i. mit einem Maximum in Woche 5 p.i. im Serum nachweisbar (Abb. 3.18A, Seite 73). Durch Quantifizierung der viralen DNA mittels Real time-PCR wurden Konzentrationen zwischen $1,4 \times 10^6$ Kopien/ml Serum (Woche 2 p.i.) und $1,95 \times 10^9$ Kopien/ml Serum (Woche 5 p.i.) ermittelt.

Die Menge der Antikörper gegen die viralen Proteine WHsAg (anti-WHsAg) und WHcAg (anti-WHcAg) im Serum wurde durch ELISA bestimmt (Abb. 3.18B). Anti-WHsAg wurde mit einem leichten Anstieg (0,126-0,249 OD_{490nm}) ab Woche 8 bis 15 p.i. detektiert. Der anti-WHcAg-Antikörper stieg beginnend bei 0,08 OD_{490nm} in Woche 5 p.i. stark an, erreichte in Woche 7 p.i. ein Maximum bei 1,25 OD_{490nm} und sank im weiteren Verlauf der Infektion auf 0,74 OD_{490nm} ab.

Die virusspezifische T-Zellantwort wurde nach Stimulation mit dem WHcAg-Peptidpool 4 mittels des optimierten CD107a-Degranulationstests ab Woche 5 p.i. bestimmt (Abb. 3.18B). Ausgehend von 7,6% CD107a+ T-Zellen fünf Wochen p.i. war die CTL-Antwort mit 11,5% CD107a+ T-Zellen in Woche 6 p.i. maximal. Nach einem Minimum von 3,1% CD107a+ T-Zellen in Woche 7 p.i. stabilisierte sich die T-Zellantwort bis 15 Wochen p.i. auf Werte bis 6,2% CD107a+ T-Zellen.

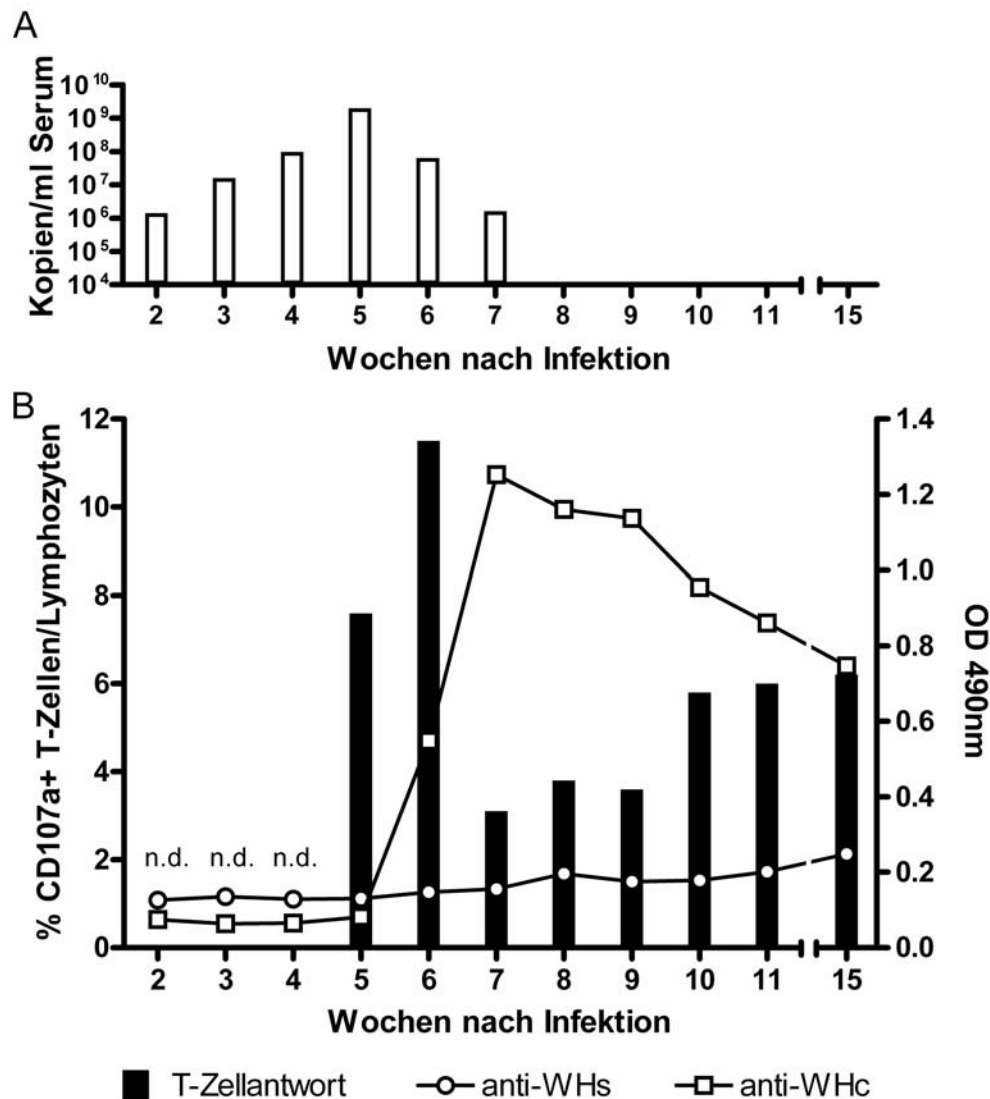


Abb. 3.18: Verlauf der akuten WHV-Infektion von Murmeltier 22524. Die experimentelle Infektion des WHV-negativen Murmeltiers wurde anhand verschiedener immunologischer Parameter wöchentlich untersucht. (A) Die virale DNA wurde mittels Real time-PCR quantifiziert. Die Nachweisgrenze lag bei 10^3 Viruskopien/Reaktion. (B) Die Antikörperantwort gegen WHsAg (anti-WHs) und gegen WHcAg (anti-WHc) wurde wöchentlich aus Serumproben bestimmt. Die CTL-Antwort wurde nach Stimulation mit dem WHcAg-Peptidpool 4 mittels des CD107a-Degranulationstests unter Verwendung von PBMC ab Woche 5 p.i. detektiert. Die Prozentzahlen geben den Anteil CD107a+ T-Lymphozyten an den eingegrenzten Zellen abzüglich der unstimulierten Kontrolle an. n.d. nicht detektiert

Abbildung 3.19 zeigt exemplarisch die durchflusszytometrische Auswertung der CTL-Antwort mit 11,5% bzw. 3,6% CD107a+ T-Zellen sechs bzw. neun Wochen nach Infektion.

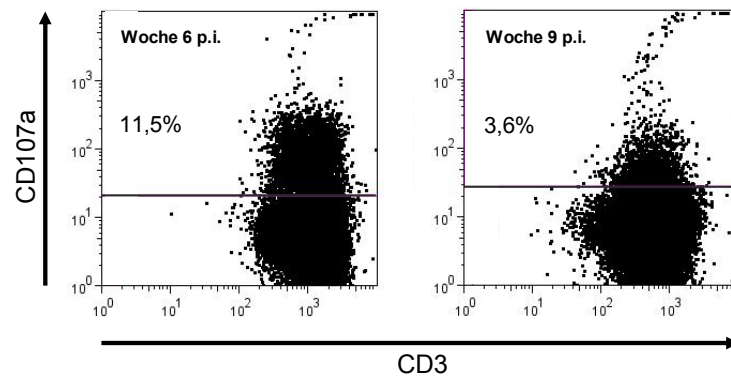


Abb. 3.19: Darstellung der CD107a-Expression stimulierter PBMC von Murmeltier 22524 während der akuten WHV-Infektion. PBMC wurden mit dem WHcAg-Peptidpool 4 stimuliert und mittels des CD107a-Degranulationstests analysiert. Hier sind exemplarisch die Auswertungen von Woche 6 und 9 p.i. dargestellt. Die Prozentzahlen geben den Anteil CD107a+ T-Lymphozyten abzüglich der unstimulierten Kontrolle an den eingegrenzten Zellen an.

Der Verlauf der WHV-Infektion von Tier 22531 ist in Abbildung 3.20 (Seite 75) dargestellt.

Die virale DNA wurde von Woche 3 bis 11 p.i. mit einem Maximum fünf Wochen nach Infektion im Serum detektiert (Abb. 3.20A). Die mittels Real time-PCR quantifizierten Virusgenomkonzentrationen lagen zwischen $1,1 \times 10^6$ Kopien/ml Serum (Woche 11 p.i.) und $1,6 \times 10^9$ Kopien/ml Serum (Woche 5 p.i.).

Die durch ELISA bestimmte Menge des anti-WHsAg-Antikörpers im Serum zeigte einen leichten Anstieg (0,145-0,293 OD_{490nm}) von Woche 8 bis 11 p.i. (Abb. 3.20B). Der anti-WHcAg-Antikörper war ab Woche 5 p.i. mit einem Maximum in Woche 9 p.i. (1,13 OD_{490nm}) nachweisbar und sank bis Woche 11 p.i. auf 1,07 OD_{490nm} ab.

Die virusspezifische CTL-Antwort zeigte mit 8,5% CD107a+ T-Zellen sechs Wochen nach Infektion ihr Maximum, sank eine Woche später auf 2,5% CD107a+ T-Zellen ab und erreichte bis Woche 11 p.i. einen Anteil von 3,2% CD107a+ T-Zellen (Abb. 3.20B).

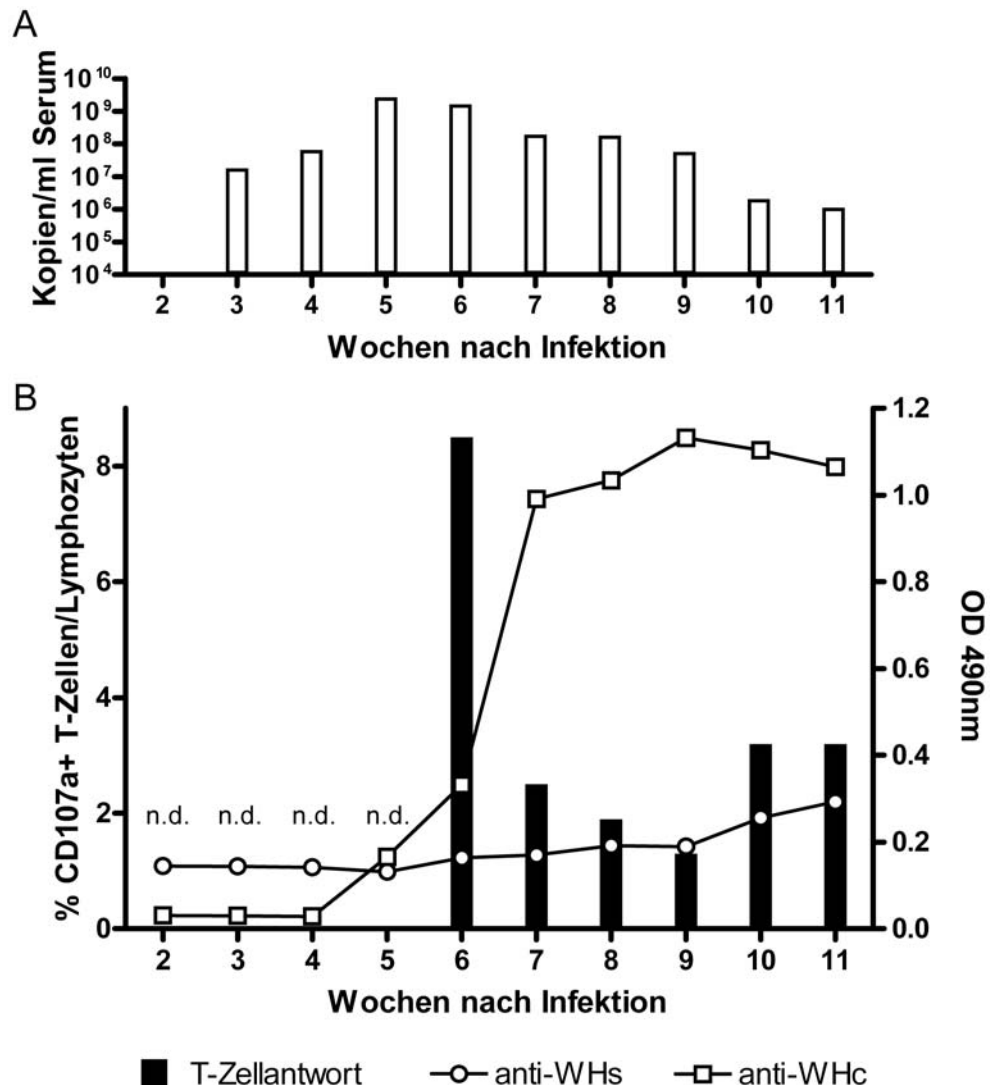


Abb. 3.20: Verlauf der akuten WHV-Infektion von Murmeltier 22531. Die experimentelle Infektion des WHV-negativen Murmeltiers wurde anhand verschiedener immunologischer Parameter wöchentlich untersucht. (A) Die virale DNA wurde mittels Real time-PCR quantifiziert. Die Nachweisgrenze lag bei 10^3 Viruskopien/Reaktion. (B) Die Antikörperantwort gegen WHsAg (anti-WHs) und gegen WHcAg (anti-WHc) wurde wöchentlich aus Serumproben bestimmt. Die CTL-Antwort wurde nach Stimulation mit dem WHcAg-Peptidpool 4 mittels des CD107a-Degranulationstests unter Verwendung von PBMC ab Woche 5 p.i. detektiert. Die Prozentzahlen geben den Anteil CD107a+ T-Lymphozyten an den eingegrenzten Zellen abzüglich der unstimulierten Kontrolle an. n.d. nicht detektiert

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass das Maximum der humoralen Immunantwort gegen WHV etwa zwei Wochen nach der maximalen Viruslast nachweisbar war. Die mit dem optimierten CD107a-Degranulationstest bestimmte zelluläre Immunantwort gegen WHV erreichte ihr Maximum eine Woche nach der maximalen Virämie.

3.9 Charakterisierung der WHcAg-spezifischen T-Zellantwort in der chronischen Phase einer WHV-Infektion

Bei chronisch WHV-infizierten Murmeltieren wie bei Patienten mit einer chronischen HBV-Infektion ist eine Proliferation von virusspezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten üblicherweise nicht nachweisbar (Menne et al., 1997). Daher stellte sich die Frage, welche Rolle die Immunantwort durch virusspezifische CTL in der chronischen Phase einer WHV-Infektion spielt.

Mit dem für PBMC optimierten CD107a-Degranulationstest wurde die WHcAg-spezifische CTL-Antwort bei chronisch WHV-infizierten Tieren analysiert. Dazu wurden Murmeltiere verwendet, bei denen über einen Beobachtungszeitraum von sechs bis acht Monaten Virusgenomkonzentrationen von $1,9 \times 10^6$ bis $9,2 \times 10^6$ Kopien/ml Serum nachweisbar waren. Die PBMC dieser Tiere (25702, 25706, 26519) wurden isoliert und für zwei Tage *in vitro* stimuliert.

Wie Abbildung 3.21 zeigt, war bei keinem der chronisch infizierten Tiere eine erhöhte Expression von CD107a nach der Stimulation mit dem WHcAg-Peptid c96-110 (0,8%-1,1% CD107a⁺ T-Zellen) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (0,9% CD107a⁺ T-Zellen) detektierbar.

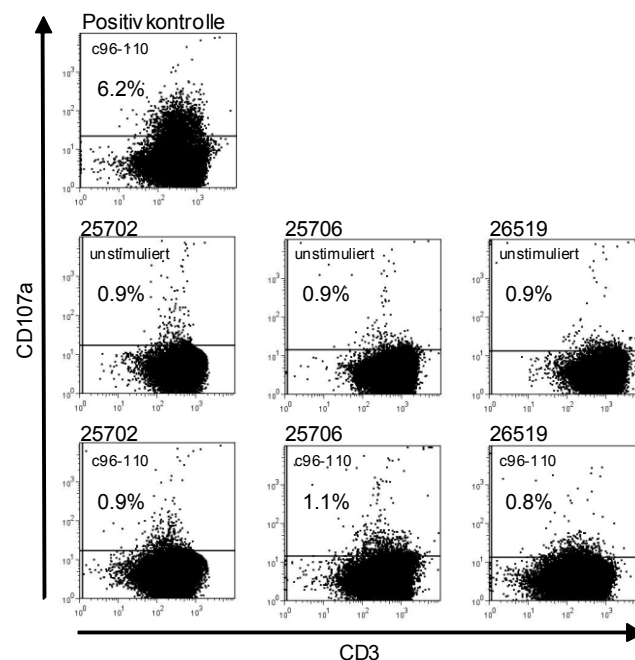


Abb. 3.21: Darstellung der CD107a-Expression stimulierter PBMC von chronisch WHV-infizierten Murmeltieren. Die PBMC der chronisch infizierten Tiere 25702, 25706 und 26519 wurden isoliert und mittels des CD107a-Degranulationstests auf ihre Expression von CD107a analysiert. Die *in vitro*-Stimulation mit dem WHcAg-Peptid c96-110 erfolgte für zwei Tage (untere Reihe). Als Negativkontrollen blieben die Zellen unstimuliert (mittlere Reihe). Peptidstimulierte PBMC eines akut WHV-infizierten Tieres dienten als Positivkontrolle (obere Reihe). Die Prozentzahlen geben den Anteil CD107a⁺ T-Lymphozyten an den eingegrenzten Zellen an.

3.10 Charakterisierung der WHsAg-spezifischen T-Zellantwort in der akuten Phase einer WHV-Infektion

Bei einer akuten, selbst-limitierenden Infektion mit HBV wurden CTL-Antworten gegen eine Vielzahl von Epitopen des Hüllproteins, des Nukleokapsidproteins und der Polymerase detektiert (Bertoletti et al., 1991; Penna et al., 1991; Nayersina et al., 1993). Nach der Identifizierung eines WHcAg-spezifischen Epitopes sollte daher das Oberflächenprotein von WHV (WHsAg) auf Peptide untersucht werden, welche die Degranulation von T-Lymphozyten induzieren. Dazu wurden PBMC von WHV-infizierten Tieren *in vitro* mit Peptidpools stimuliert, welche das gesamte WHsAg abdecken (Abb. 3.22). Nach einer Restimulation am zweiten Tag wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD3, CD4 und CD107a gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

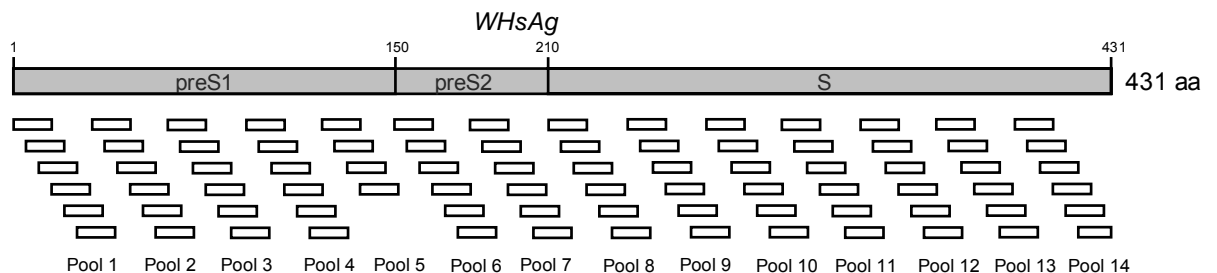


Abb. 3.22: Schematische Darstellung der zur Stimulation verwendeten WHsAg-Peptide. Die 82 Pentadekamere decken den gesamten Bereich des WHsAg (431 Aminosäuren [aa]) ab und überlappen um jeweils zehn Aminosäuren. Mit Ausnahme des Pools 5, welcher vier Peptide enthielt, wurden jeweils sechs Peptide in insgesamt 14 Pools zusammengefasst.

Als einziges Peptid, das eine Expression von CD107a bei den analysierten T-Lymphozyten hervorrief, wurde dabei das Peptid s220-234 in Pool 8 identifiziert.

Daraufhin wurde die CTL-Antwort nach Stimulation mit dem WHsAg-Peptidpool 8 sowie mit dem Peptid s220-234 im Verlauf der akuten WHV-Infektion der Marmosetter 22524 und 22531 bestimmt.

Bei Tier 22524 war die Messung und Auswertung der T-Zellantwort gegen Peptidpool 8 in den Wochen 5, 6, 8, 10 und 15 p.i. durchführbar, gegen das Peptid s220-234 in den Wochen 8, 10 und 15 p.i. (Abb. 3.23A, Seite 78). Die Stimulation mit Peptidpool 8 induzierte zwischen 0,3% und 1,8% CD107a+ T-Zellen, die Stimulation mit s220-234 zwischen 0,3% und 1,4% CD107a+ T-Zellen. Im Vergleich dazu resultierte die Stimulation mit dem

WHcAg-Peptidpool 4 in 3,8% bis 11,5% CD107a+ T-Zellen. Die Stimulation mit einem Fremdpeptid (CMV-Peptid) zeigte 0% bis 0,2% CD107a+ T-Zellen.

Die T-Zellantwort von Tier 22531 gegen den WHsAg-Peptidpool 8 war in den Wochen 6, 8 und 10 p.i. analysierbar, gegen das Peptid s220-234 in den Wochen 8 und 10 p.i. (Abb. 3.23B). Die Prozentzahlen für die durch Stimulation induzierten CD107a+ T-Zellen lagen zwischen 0,7 und 1,6 (Peptidpool 8) bzw. 0,2 und 0,5 (s220-234) und damit deutlich über den Werten des Kontrollpeptids (0% CD107a+ T-Zellen) und unter denjenigen der WHcAg-spezifischen CTL-Antwort (1,9-8,5% CD107a+ T-Zellen).

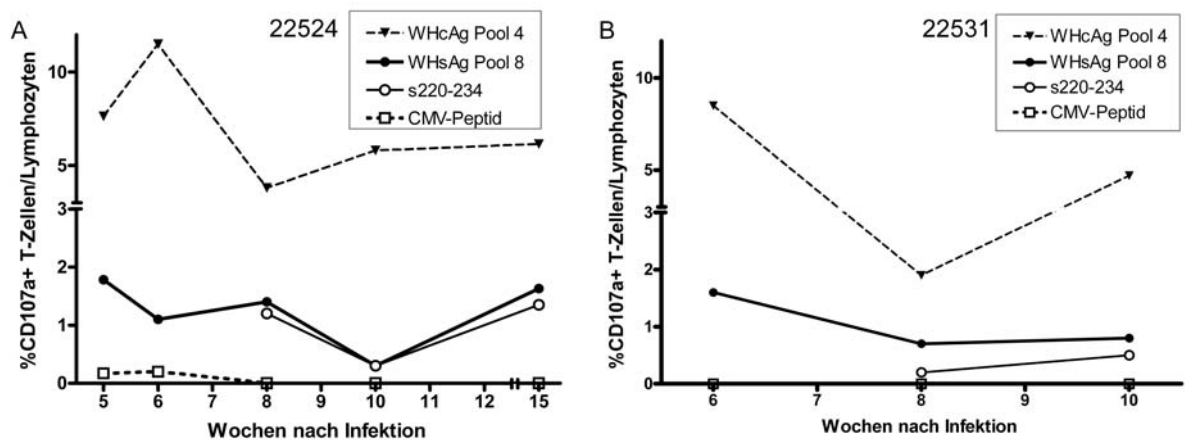


Abb. 3.23: Verlauf der WHsAg-spezifischen T-Zellantwort in der akuten Phase einer WHV-Infektion. Die PBMC der akut WHV-infizierten Marmosetter 22524 und 22531 wurden wie angegeben *in vitro* für zwei Tage stimuliert und anschließend mittels des CD107a-Degranulationstests analysiert. Die Prozentzahlen geben den Anteil CD107a+ T-Lymphozyten an den eingegrenzten Zellen abzüglich der unstimulierten Kontrolle an.

Mit dem Peptid s220-234 des WHV-Oberflächenproteins WHsAg wurde somit ein weiteres CTL-Epitop identifiziert. Ferner wurde die Kinetik dieser WHsAg-spezifischen CTL-Antwort in der akuten Phase einer WHV-Infektion gezeigt.

3.11 Bestimmung des MHC Klasse I-Status der verwendeten Murmeltiere

Da die Mehrheit der in dieser Arbeit untersuchten Tiere das identifizierte WHcAg-Epitop c96-110 erkannt hatte, wurde ein teilweise identischer MHC-Hintergrund bei diesen Tieren vermutet. Um dieser Frage nachzugehen wurde eine Typisierung der MHC Klasse I-Allele, den so genannten *Mamo I*-Allelen, vorgenommen. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus kryokonservierten PBMC isoliert, mit dem Primer Y7 selektiv in cDNA umgeschrieben und diese unter Verwendung der Primerpaare Y3/Y4 bzw. Y2/Y5 in einer PCR amplifiziert (Abb. 3.24).

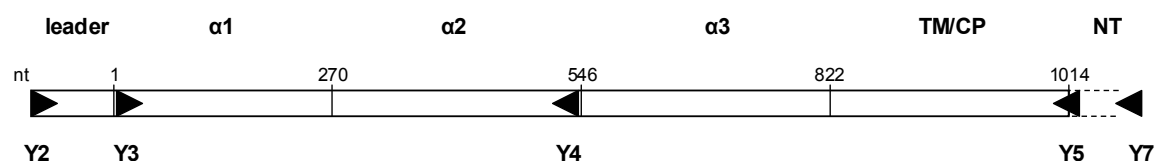


Abb. 3.24: Schematische Darstellung der Woodchuck-MHC Klasse I-mRNA.

Die mRNA-Sequenz des Woodchuck-MHC Klasse I-Gens unterteilt sich in eine leader-Sequenz und die Abschnitte für die Domänen α1, α2 und α3. Es folgen die Regionen für die Transmembrandomäne (TM) und die zytoplasmatische Domäne (CP) sowie ein nicht translater Bereich (NT). Die bei der α1-Region beginnende Nummerierung gibt das erste Nukleotid (nt) der jeweiligen Region an. Die Primer Y2, Y3, Y4, Y5 und Y7 wurden für die Klonierung verwendet (modifiziert nach Yang et al., 2000).

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden kloniert, sequenziert und mittels der Software VectorNTI[®] analysiert. Die phylogenetische Analyse erfolgte dabei für die α1-Region (nt 33-274), da in diesem Bereich die meisten Sequenzunterschiede der verschiedenen Allele lokalisiert sind (Yang et al., 2000). Anhand eines Baumdiagramms wurde die Ähnlichkeit der ermittelten Sequenzen zu den bereits in GenBank veröffentlichten *Mamo I*-Allelen bestimmt.

Für zwei WHV-negative Murmeltiere (30341, 30342), zwei im Verlauf der Arbeit akut WHV-infizierte Tiere (22524, 22531) sowie für ein Tier mit ausgeheilter WHV-Infektion (21032) wurden klonierte *Mamo I*-Sequenzen ausgewertet (Abb. 3.25, Seite 80). Für eine Sequenz des Tieres 30341 wurde eine nahe Verwandtschaft zu Allel A*15 ermittelt. Die MHC I-Sequenzen von Tier 30342 ähnelten am stärksten den Allelen A*07 und A*15. Für Tier 22531 wurden Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu den *Mamo I*-Allelen A*07 und A*12 identifiziert. Die für die Tiere 22524 und 21032 erhaltenen *Mamo I*-Sequenzen zeigten die stärkste Ähnlichkeit zu Allel A*07.

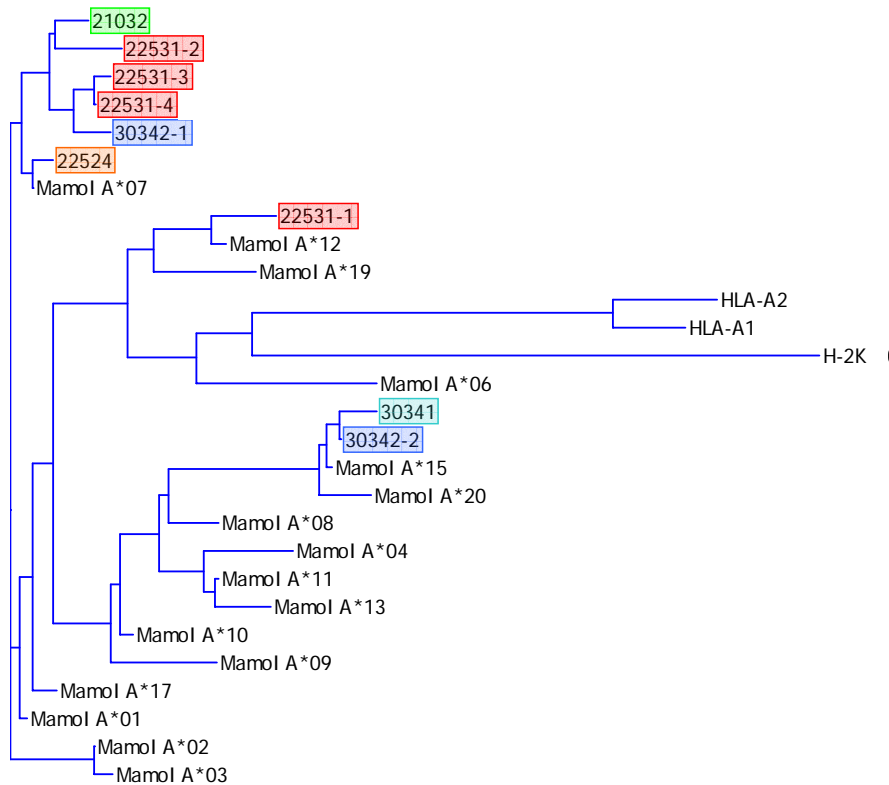


Abb. 3.25: Phylogenetischer Baum der $\alpha 1$ -Region von MHC Klasse I-Nukleotidsequenzen. Die MHC I-Sequenzen von fünf in dieser Arbeit verwendeten Murmeltieren wurden kloniert, sequenziert und bezüglich der $\alpha 1$ -Region analysiert. Dazu wurden die Sequenzen mit in GenBank publizierten MHC I-Allelen des Menschen (HLA), der Maus (H-2) und des Murmeltiers (Mamo I) verglichen. In die Auswertung wurden je eine Sequenz der Murmeltiere 21032, 22524 und 30341 einbezogen. Von Tier 30342 waren zwei Sequenzen (30342-1 und -2) für die Auswertung verfügbar, von Tier 22531 vier Sequenzen (22531-1 bis -4). Dem Baumdiagramm liegt der Neighbor Joining (NJ)-Algorithmus zugrunde.

4. Diskussion

Für die Eliminierung des Hepatitis B-Virus (HBV) nach einer Infektion wird ein Zwei-Schritt-Mechanismus postuliert, bei dem virusspezifische T-Lymphozyten eine zentrale Rolle spielen: In der Anfangsphase der Infektion werden von virusspezifischen T-Zellen Zytokine wie IFN γ freigesetzt, welche die virale Replikation inhibieren. Die Eliminierung infizierter Zellen erfolgt anschließend durch die zytolytische Aktivität dieser zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL). Daneben sind virusspezifische T-Helferzellen für die Viruseliminierung wichtig, da sie unter anderem eine B-Zellantwort mit virusneutralisierenden Antikörpern induzieren und dadurch eine Neuinfektion von Hepatozyten verhindern. Für die Kontrolle der hepadnaviralen Infektion wird daher beiden Teilen der zellulären Immunantwort – der T-Helferzellantwort und der CTL-Antwort – eine entscheidende Bedeutung beigemessen.

Die durch virusspezifische T-Helferzellen vermittelte Immunantwort wurde in Woodchuck Hepatitis Virus (WHV)-infizierten Murmeltieren bereits gut charakterisiert. Sie entspricht den Befunden beim Menschen (Menne et al., 1997). Für die umfassende Nutzung dieses Tiermodells ist jedoch auch die Bestimmung der Immunantwort durch virusspezifische CTL notwendig, die bislang nicht durchgeführt werden konnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, WHV-spezifische CTL nachzuweisen, CTL-Epitope zu identifizieren und die Kinetik der CTL-Antwort nach der akuten Infektion zu bestimmen.

4.1 Charakterisierung von T-Zellepitopen des WHsAg in der Maus

Da ein Nachweis WHV-spezifischer CTL im Woodchuck bisher nicht möglich war, wurde bei Mäusen eine DNA-Vakzinierung gegen das Oberflächenprotein von WHV (WHsAg) durchgeführt. Ziel dieser Versuche war es, antigenspezifische CTL in diesem etablierten Tiermodell aufzuzeigen und geeignete Detektionsmethoden zu optimieren. Da im Mausmodell zelluläre Immunantworten gegen das Hüllprotein von HBV (HBsAg) gezeigt wurden (Schirmbeck et al., 2001; Sette et al., 2001), wurde entsprechend für diesen ersten Teil der Arbeit das WHsAg ausgewählt.

Zum Nachweis von Epitopen innerhalb des WHsAg wurde für Splenozyten von Mäusen, die mit WHsAg-DNA immunisiert worden waren, ein *in vitro*-Stimulationsprotokoll mit anschließender intrazellulärer Zytokinfärbung etabliert. Die durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Zytokine wie Interferon γ (IFN γ) hat sich für die Epitopkartierung von antigen-spezifischen T-Lymphozyten in verschiedenen Systemen bewährt (Kern et al., 1998; Suni et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden dadurch mehrere über die preS2/S-Region des WHsAg verteilte Bereiche identifiziert, welche potenzielle T-Zellepitope enthielten. In diesen Bereichen wurden zwei Peptide kartiert, welche bei CD4⁺ Zellen eine starke Immunantwort induzierten. Ein Epitop für CD8⁺ T-Lymphozyten konnte nicht identifiziert werden. Diese Ergebnisse waren nicht erwartet, da ein Hauptmerkmal von DNA-Vakzinen die Induktion CD8⁺ T-Zellantworten ist. Dieses Priming wird durch die endogene Expression und Prozessierung des transfizierten Antigens erklärt, welche in der Präsentation über MHC Klasse I-Proteine und damit der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen resultieren (Ulmer et al., 1993). Dabei wurde gezeigt, dass vor allem wenige direkt transfizierte professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC), wie z.B. Dendritische Zellen (DC), für die Induktion der Immunantworten nach einer DNA-Vakzinierung verantwortlich sind (Casares et al., 1997; Porgador et al., 1998; Akbari et al., 1999). Die dennoch effiziente Induktion breiter und anhaltender Immunantworten wird mit den immunstimulativen Eigenschaften der DNA-Struktur begründet. Motive aus unmethylierten Cytidin-Phosphat-Guanosin (CpG)-Dinukleotiden, welche in mikrobieller DNA häufiger vorkommen als in Säugetier-DNA, induzieren hierbei die Sekretion von Zytokinen durch APCs (Klinman et al., 1996; Stacey et al., 1996; Jakob et al., 1998). Das Zytokinmilieu, welches zum Zeitpunkt des T-Zell-Primings vorherrscht, ist jedoch für die Differenzierung von T-Helferzellen entscheidend (Seder et al., 1994; O'Garra et al., 1998). So wurde die Generierung einer T_H1-dominierten Immunantwort durch DNA-Immunisierung bei verschiedenen Infektionen, wie z.B. mit dem Respiratorischen Synzytial-Virus (RSV) oder *Leishmania major*, gezeigt (Li et al., 1998; Roman et al., 1997; Zimmermann et al., 1998). Der in dieser Arbeit verwendete DNA-Impfstoff gegen WHsAg könnte daher aufgrund seiner Struktur oder Zusammensetzung das T-Zell-Priming hinsichtlich einer T-Helferzell-dominierten Immunantwort beeinflussen haben.

Die vorliegenden Resultate zur Epitopkartierung des WHsAg können in weitergehenden Studien an WHV-transgenen Mäusen dazu beitragen, den Einfluss der T-Zellsubpopulationen in der Pathogenese einer hepadnaviralen Infektion nachzuweisen. Grundlage dieser Experimente ist der adoptive Transfer der virusspezifischen T-Lymphozyten, welcher von der Arbeitsgruppe um Chisari für HBV-transgene Mäuse beschrieben wurde. Dadurch wurde die Rolle HBsAg-spezifischer CTL für die Entwicklung einer nekro-inflammatorischen Lebererkrankung bei HBV-transgenen Mäusen gezeigt (Moriyama et al., 1990). Weitere Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe wiesen darauf hin, dass CD4⁺ Zellen des T_H1-Typs direkt zur Pathogenese im transgenen Mausmodell beitragen könnten (Franco et al., 1997).

4.2 Etablierung einer Nachweismethode für virusspezifische zytotoxische T-Lymphozyten im Woodchuck-Modell

Zytotoxische T-Lymphozyten verfügen über unterschiedliche Effektorfunktionen zur Eliminierung eines Virus. Die zugrunde liegenden Mechanismen beruhen auf der Sekretion von IFN γ zur Inhibition der Virusreplikation einerseits und der Zerstörung infizierter Zellen durch zytotoxische Moleküle andererseits. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Methoden etabliert, um virusspezifische Effektorzellen und ihre Funktionen zu charakterisieren. Einige dieser Methoden stellen funktionale Tests dar, welche die Freisetzung von IFN γ oder die zytotoxische Aktivität der Zellen detektieren. Daneben werden Tetramere von MHC (*engl. major histocompatibility complex*) Klasse I-Molekülen verwendet, um Epitop-spezifische Lymphozyten funktions-unabhängig nachzuweisen. Diese Methoden sind jedoch im Murmeltiermodell nicht anwendbar. Beispielsweise ist die Durchführung eines ELISpot-Assays zum Nachweis IFN γ -produzierender Zellen aufgrund fehlender spezifischer Antikörper gegen Woodchuck-IFN γ nicht durchführbar. Ferner verliefen Versuche, den Standard-Chromfreisetzungstest unter Verwendung WHsAg- oder WHcAg-exprimierender Vacciniaviren ins Woodchuck-System zu übertragen, bislang nicht erfolgreich (P. Sarobe, persönliche Mitteilung).

Die Arbeitsgruppe von Betts entwickelte eine neuartige Nachweismethode, welche die zytolytische Effektorfunktion virusspezifischer CTL direkt detektiert (Betts et al., 2003). Sie beruht auf dem durchflusszytometrischen Nachweis des

degranulationsassoziierten Moleküls CD107a auf der T-Zelloberfläche. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde diese Methode für das Woodchuck-Modell der hepadnaviralen Infektion etabliert. Grundlegende Voraussetzung dafür war zunächst die Identifizierung eines geeigneten kreuzreaktiven Antikörpers gegen das Woodchuck-CD107a-Protein, welche nachfolgend beschrieben wird.

4.2.1 Klonierung der Woodchuck-CD107a-DNA-Sequenz

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Fragment der Woodchuck-CD107a-DNA-Sequenz kloniert und mit CD107a-Sequenzen anderer Spezies verglichen. Datenbankanalysen offenbarten für den potenziell kodierenden Bereich des Fragmentes Ähnlichkeiten zwischen 68% und 79% zu den CD107a-Proteinsequenzen von Mensch, Maus und Javaneraffe. Daher wurde untersucht, ob kommerziell erhältliche monoklonale anti-CD107a Antikörper dieser Spezies mit dem CD107a-Protein des Murmeltiers kreuzreagieren. In Vorversuchen wurden zwei kommerzielle monoklonale Antikörper gegen das humane sowie ein Antikörper gegen das murine CD107a-Protein getestet. Der anti-Maus CD107a-Antikörper zeigte eine spezifische Bindung zu den Woodchuck-Lymphozyten und wurde deshalb in den folgenden Experimenten verwendet.

Das Epitop dieses monoklonalen Antikörpers innerhalb der murinen CD107a-Sequenz ist nicht bekannt. Chen und Mitarbeiter zeigten, dass der Antikörper in einer Region nahe der begrenzenden lysosomalen Membran bindet (Chen et al., 1985 und 1988). Ein Vergleich des Bereiches vor der Transmembrandomäne bei den CD107a-Proteinsequenzen von Maus und Murmeltier ergab große Ähnlichkeiten, welche die Kreuzreaktivität des murinen Antikörpers für Woodchuck-Zellen erklären könnten.

4.2.2 Etablierung des CD107a-Degranulationstests

In den vorliegenden durchflusszytometrischen Experimenten zur Charakterisierung zytotoxischer T-Lymphozyten im Murmeltiermodell gelang es erstmals, WHV-spezifische CTL nachzuweisen. Diese Versuche basierten auf einem neu etablierten Protokoll zur Detektion des Degranulationsmarkers CD107a auf peptidstimulierten Lymphozyten. Kontrollexperimente mit Splenozyten naiver Murmeltiere bestätigten, dass die Stimulation mit viralen

Peptiden keine falsch-positive Antwort hervorrief. Mit dieser Nachweismethode wurde bei immunen Tieren die Degranulation von Splenozyten und von Lymphozyten aus mesenterialen Lymphknoten gezeigt. Somit wurden vermutlich virusspezifische Gedächtnis-T-Zellen nachgewiesen, welche nach der ausgeheilten Infektion in diesen lymphatischen Organen persistierten. Nach der Optimierung des Stimulationsprotokolls war zudem der Nachweis potenziell aktivierter virusspezifischer CTL aus dem peripheren Blut akut WHV-infizierter Tiere möglich.

Zur genaueren Phänotypisierung der T-Lymphozyten wurde eine Färbung mit Antikörpern gegen CD3 und CD4 durchgeführt, da ein Antikörper gegen Woodchuck-CD8 nicht erhältlich ist. Dadurch wurde gezeigt, dass die Zellen, welche nach Peptidstimulation CD107a auf der Zelloberfläche präsentierten, der CD3+CD4- Population zuzuordnen waren und damit der Definition von CD8+ T-Lymphozyten entsprachen. Dies steht in Einklang mit verschiedenen Veröffentlichungen, in denen die Expression des Degranulationsmarkers für die Population der CD8+ T-Lymphozyten gezeigt wurde (Rubio et al., 2003; Zelinskyy et al., 2005). Die Stärke der CD107a-Antworten von T-Lymphozyten im Woodchuck-Modell war vergleichbar mit den Resultaten anderer Studien (Betts et al., 2003; Elrefaei et al., 2006).

Die Expression von CD107a ist mit der Sekretion von Granzym B, einer Apoptose-induzierenden Serinprotease, sowie mit der Apoptose der Zielzelle assoziiert (Burkett et al., 2005). Mit dem CD107a-Degranulationstest wird somit direkt das zytolytische Potenzial von CTL gezeigt (Betts et al., 2003). Daher kann für die detektierten WHV-spezifischen CTL ein direkter zytolytischer Effektormechanismus auf Basis des Granula-abhängigen Exocytoseweges vermutet werden.

4.2.3 Kartierung von MHC I-restringierten Epitopen des WHcAg und des WHsAg

Zur Identifizierung von Epitopen des WHcAg und des WHsAg wurden Lymphozyten von akut oder post-akut WHV-infizierten Murmeltieren mit Einzelpeptiden dieser Virusproteinsequenzen stimuliert. Die Analyse wurde mit dem neu etablierten und optimierten CD107a-Degranulationstest durchgeführt.

Dabei wurde innerhalb des WHcAg ein Peptid identifiziert, welches ein potenzielles CTL-Epitop beinhaltet (c96-110). Die Tatsache, dass ein einzelnes MHC I-restringiertes Epitop im Nukleokapsidprotein von WHV gefunden wurde, steht im Einklang mit Publikationen, welche das Vorkommen einzelner MHC I-restringierter Epitope für das Kapsidprotein von HBV beschreiben. Bertoletti und Kollegen identifizierten als Epitop für HLA-A2-restringierte CTL ein Peptid mit den Aminosäuren 18-27 des HBcAg (Bertoletti et al., 1993). HLA-A31- und HLA-Aw68-restringierte CTL präsentieren das HBcAg-Peptid 141-151, wie von Missale und Kollegen gezeigt wurde (Missale et al., 1993).

Das Peptid c96-110, das ein mögliches CTL-Epitop enthält, ist nahezu identisch mit dem Peptid c97-110, welches in einer früheren Studie als potenzielles T-Helferzellepitop bestimmt wurde (Menne et al., 1997). Die zugrunde liegenden Experimente wurden mit einem für Woodchuck-PBMC adaptierten Proliferationstest durchgeführt. Da durch einen Proliferationstest üblicherweise T-Helferzellen stimuliert werden (Ferrari et al., 1991; Jung et al., 1995), wurde vermutet, dass es sich bei den proliferierenden Zellen um T-Helferzellen handelt. Eine genauere Charakterisierung der T-Zellsubpopulation war jedoch aufgrund fehlender Antikörper gegen spezifische Oberflächenmarker zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Technik der Durchflusszytometrie erlaubte hingegen eine detailliertere Phänotypisierung der peptidspezifischen T-Zellen. Zusammen mit der angewandeten Detektionsmethode, welche hauptsächlich für CD8⁺ T-Lymphozyten beschrieben wurde, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass das Peptid c96-110 ein mögliches CTL-Epitop enthält.

Erkenntnisse über die optimale Länge von T-Zellepitopen im Woodchuck-Modell liegen derzeit noch nicht vor. Experimente zur Bestimmung der minimalen Aminosäuresequenz des 15 Aminosäuren umfassenden Peptides werden weitere Hinweise auf die Art dieses Epitopes geben.

Die meisten Murmeltiere, die für die experimentellen Infektionen verwendet wurden, erkannten das identifizierte WHcAg-Epitop, obwohl sie keine Inzuchttiere waren. Aufgrund einer engen Verwandtschaftsbeziehung von vier der sechs immunen Individuen (ein Muttertier mit drei Nachkommen) wurde bei

den verwendeten Tieren ein teilweise identischer MHC I-Hintergrund vermutet. Eine Typisierung der MHC I-Allele, die im Murmeltier *Mamo I* genannt werden (Yang et al., 2000), sollte Aufschluss darüber geben. Die Analyse von fünf exemplarisch ausgewählten Tieren deutete jedoch nicht auf das Vorhandensein eines häufig auftretenden Allels hin. Es zeigte sich, dass die identifizierten Sequenzen starke Ähnlichkeiten zu den früher beschriebenen *Mamo I*-Allelen *A*07*, *A*12* und *A*15* aufwiesen, jedoch nicht identisch dazu waren. Weitere Studien müssen klären, ob es sich bei den vorliegenden Sequenzen um neue Genvarianten des *A*-Lokus von *Mamo I* handeln könnte. Bislang wurden für diesen Lokus 20 Allele identifiziert, welche in ihrer Struktur denen des Menschen ähneln (Yang et al., 2000; Zhou et al., 2003). Die Anzahl der tatsächlich vorhandenen Allele liegt vermutlich beträchtlich höher, wenn zum Vergleich Daten für das humane MHC I-System zugrunde gelegt werden: Derzeit sind Informationen über mehr als 500 HLA-A-Allele und über fast 900 HLA-B-Allele in der Datenbank des internationalen ImMunoGeneTics-Projektes (*IMGT/HLA database*; www.ebi.ac.uk/imgt/hla/; Stand April 2007) verfügbar. Die *Mamo I*-Typisierung von Murmeltieren stellt folglich eine umfangreiche Aufgabe dar, welche in zukünftigen Studien bearbeitet werden wird.

Unter Verwendung des optimierten CD107a-Degranulationstests wurde bislang ein einzelnes potenzielles CTL-Epitop innerhalb des Oberflächenproteins von WHV (s220-234) detektiert. Im Gegensatz dazu wurden von Nayersina und Kollegen für das Hüllprotein von HBV elf CTL-Epitope beschrieben (Nayersina et al., 1993). Da in der vorliegenden Arbeit jedoch nur zwei akut WHV-infizierte Tiere hinsichtlich ihrer zellulären Immunantwort gegen das WHsAg untersucht wurden, können die Experimente zur WHsAg-Epitopkartierung nicht als abgeschlossen betrachtet werden. Studien mit weiteren WHV-infizierten Tieren sind nötig, um die WHsAg-spezifische CTL-Antwort genauer zu charakterisieren.

4.3 Kinetik der virusspezifischen CTL-vermittelten Immunantwort im Verlauf der akuten und der chronischen WHV-Infektion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, welche Bedeutung die virusspezifische CTL-Antwort während der akuten bzw. der chronischen Phase einer WHV-Infektion hat.

Die zur Charakterisierung der Akutphase erhobenen Kinetiken wurden fünf Wochen nach der experimentellen Infektion begonnen, da vor diesem Zeitpunkt aufgrund von Studien mit Menschen und Schimpansen keine zelluläre Immunantwort gegen virale Antigene zu erwarten war (Webster et al., 2000; Thimme et al., 2003). Im untersuchten Zeitraum zeigte sich eine starke CTL-Antwort gegen das WHcAg-Epitop mit einem Maximum sechs Wochen nach Infektion. Damit assoziiert war eine Reduktion der Viruslast im Blut bis hin zur Eliminierung des Virus. In Übereinstimmung mit Studien, welche mit akut HBV-infizierten Patienten bzw. mit experimentell HBV-infizierten Schimpansen durchgeführt wurden, wurde dadurch die Hypothese gestärkt, dass für die Eliminierung der Hepadnaviren die spezifische CTL-Antwort in der Frühphase der Infektion essentiell ist (Webster et al., 2000; Thimme et al., 2003). Diese polyklonale und multispezifische CTL-Antwort kennzeichnet den Verlauf einer akut selbst-limitierenden HBV-Infektion (Bertoletti et al., 1991; Rehermann et al., 1995; Maini et al., 1999). Virusspezifische CTL spielen auch für die Kontrolle anderer viraler Infektionen eine wichtige Rolle, wie beispielsweise für das Influenza-Virus oder HIV (*Humanes Immundefizienz-Virus*) gezeigt wurde (Topham et al., 1997; Lieberman et al., 2001).

Bei chronisch WHV-infizierten Tieren war keine CTL-Antwort gegen das WHcAg-Epitop detektierbar. Da nur die Immunantwort gegen das Peptid c96-110 untersucht wurde, kann jedoch eine gegen andere Epitope von WHcAg oder WHsAg gerichtete CTL-Antwort nicht ausgeschlossen werden. Daher bleibt zu klären, ob die Persistenz des Virus und damit der chronische Verlauf einer hepadnaviralen Infektion mit einer schwachen und oligoklonalen CTL-Antwort assoziiert ist, wie für HBV gezeigt wurde (Rehermann et al., 1996a und b).

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die WHV-spezifische CTL-Antwort in WHV-infizierten Murmeltieren bestimmt und ein CTL-Epitop innerhalb des WHcAg identifiziert. Der Nachweis virusspezifischer CTL-Antworten wird in zukünftigen Pathogenesestudien Verwendung finden, in denen sehr frühe Stadien der hepadnaviralen Infektion im Murmeltiermodell untersucht werden. Bei HBV-infizierten Menschen ist diese Analyse in der frühen Phase aufgrund des oftmals unbekannten Infektionszeitpunktes limitiert. Eine weitere wichtige Anwendung der neu etablierten Detektionsmethode besteht im Monitoring von Immuntherapiestudien. Neuartige Ansätze zur Therapie der chronischen Infektion wie z.B. die therapeutische Vakzinierung unter antiviraler Behandlung können dadurch im Woodchuck-Modell umfassend untersucht werden. Darauf aufbauend kann die Entwicklung neuer Humanimpfstoffe und innovativer Therapiekonzepte für die Behandlung der chronischen Hepatitis B vorangetrieben werden.

5. Literaturverzeichnis

- Akbari, O., N. Panjwani, S. Garcia, R. Tascon, D. Lowrie, and B. Stockinger. 1999. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J Exp Med* 189:169-78.
- Araki, K., J. Miyazaki, O. Hino, N. Tomita, O. Chisaka, K. Matsubara, and K. Yamamura. 1989. Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:207-11.
- Barker, L. F., J. E. Maynard, R. H. Purcell, J. H. Hoofnagle, K. R. Berquist, and W. T. London. 1975. Viral hepatitis, type B, in experimental animals. *Am J Med Sci* 270:189-95.
- Barnaba, V., A. Franco, A. Alberti, C. Balsano, R. Benvenuto, and F. Balsano. 1989. Recognition of hepatitis B virus envelope proteins by liver-infiltrating T lymphocytes in chronic HBV infection. *J Immunol* 143:2650-5.
- Bauer, T. 2002. Untersuchungen zur zellulären Immunantwort nach Impfung gegen das Hepatitis B-Virus. Dissertation, Universität Regensburg.
- Bavand, M., M. Feitelson, and O. Laub. 1989. The hepatitis B virus-associated reverse transcriptase is encoded by the viral pol gene. *J Virol* 63:1019-21.
- Beasley, R. P., L. Y. Hwang, C. C. Lin, and C. S. Chien. 1981. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 2:1129-33.
- Bermingham, N. A., J. E. Martin, and E. M. Fisher. 1996. The mouse lysosomal membrane protein 1 gene as a candidate for the motorneuron degeneration (mnd) locus. *Genomics* 32:266-71.
- Bertoletti, A., C. Ferrari, F. Fiaccadori, A. Penna, R. Margolskee, H. J. Schlicht, P. Fowler, S. Guilhot, and F. V. Chisari. 1991. HLA class I-restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10445-9.
- Bertoletti, A., F. V. Chisari, A. Penna, S. Guilhot, L. Galati, G. Missale, P. Fowler, H. J. Schlicht, A. Vitiello, R. C. Chesnut, and et al. 1993. Definition of a minimal optimal cytotoxic T-cell epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid protein. *J Virol* 67:2376-80.
- Betts, M. R., J. M. Brenchley, D. A. Price, S. C. De Rosa, D. C. Douek, M. Roederer, and R. A. Koup. 2003. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 281:65-78.
- Block, T. M., X. Lu, A. S. Mehta, B. S. Blumberg, B. Tennant, M. Ebling, B. Korba, D. M. Lansky, G. S. Jacob, and R. A. Dwek. 1998. Treatment of chronic hepadnavirus infection in a woodchuck animal model with an inhibitor of protein folding and trafficking. *Nat Med* 4:610-4.

- Botta, A., M. Lu, X. Zhen, T. Kemper, and M. Roggendorf. 2000. Naturally occurring woodchuck hepatitis virus (WHV) deletion mutants in chronically WHV-infected woodchucks. *Virology* 277:226-34.
- Burkett, M. W., K. A. Shafer-Weaver, S. Strobl, M. Baseler, and A. Malyguine. 2005. A novel flow cytometric assay for evaluating cell-mediated cytotoxicity. *J Immunother* (1997) 28:396-402.
- Carlsson, S. R., and M. Fukuda. 1989. Structure of human lysosomal membrane glycoprotein 1. Assignment of disulfide bonds and visualization of its domain arrangement. *J Biol Chem* 264:20526-31.
- Casares, S., K. Inaba, T. D. Brumeanu, R. M. Steinman, and C. A. Bona. 1997. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J Exp Med* 186:1481-6.
- Chen, J. W., T. L. Murphy, M. C. Willingham, I. Pastan, and J. T. August. 1985. Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. *J Cell Biol* 101:85-95.
- Chen, J. W., Y. Cha, K. U. Yuksel, R. W. Gracy, and J. T. August. 1988. Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding lysosomal membrane glycoprotein mouse LAMP-1. Sequence similarity to proteins bearing onco-differentiation antigens. *J Biol Chem* 263:8754-8.
- Chen, H. S., M. C. Kew, W. E. Hornbuckle, B. C. Tennant, P. J. Cote, J. L. Gerin, R. H. Purcell, and R. H. Miller. 1992. The precore gene of the woodchuck hepatitis virus genome is not essential for viral replication in the natural host. *J Virol* 66:5682-4.
- Chisari, F. V., C. A. Pinkert, D. R. Milich, P. Filippi, A. McLachlan, R. D. Palmiter, and R. L. Brinster. 1985. A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. *Science* 230:1157-60.
- Chisari, F. V. 1997. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. In: *Viral hepatitis and liver disease*. Rizzetto, M.; Purcell, RH.; Gerin, JL; Verme G. (Hrsg.):405-415.
- Cote, P. J., B. E. Korba, R. H. Miller, J. R. Jacob, B. H. Baldwin, W. E. Hornbuckle, R. H. Purcell, B. C. Tennant, and J. L. Gerin. 2000. Effects of age and viral determinants on chronicity as an outcome of experimental woodchuck hepatitis virus infection. *Hepatology* 31:190-200.
- Cullen, J. M., S. L. Smith, M. G. Davis, S. E. Dunn, C. Botteron, A. Cecchi, D. Linsey, D. Linzey, L. Frick, M. T. Paff, A. Goulding, and K. Biron. 1997. In vivo antiviral activity and pharmacokinetics of (-)-cis-5-fluoro-1-[2-(hydroxymethyl)-1,3-oxathiolan-5-yl]cytosine in woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2076-82.
- Cullen, J. M., D. H. Li, C. Brown, E. J. Eisenberg, K. C. Cundy, J. Wolfe, J. Toole, and C. Gibbs. 2001. Antiviral efficacy and pharmacokinetics of oral adefovir dipivoxil in chronically woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2740-5.

- Dahmen, U., O. Dirsch, J. Li, M. Fiedle, M. Lu, K. Rispeter, M. Picucci, C. E. Broelsch, and M. Roggendorf. 2004. Adoptive transfer of immunity: a new strategy to interfere with severe hepatitis virus reinfection after woodchuck liver transplantation. *Transplantation* 77:965-72.
- Dane, D. S., C. H. Cameron, and M. Briggs. 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1:695-8.
- Davis, H. L., M. L. Michel, M. Mancini, M. Schleef, and R. G. Whalen. 1994. Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen. *Vaccine* 12:1503-9.
- de Franchis, R., G. Meucci, M. Vecchi, M. Tatarella, M. Colombo, E. Del Ninno, M. G. Rumi, M. F. Donato, and G. Ronchi. 1993. The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers. *Ann Intern Med* 118:191-4.
- Donello, J. E., J. E. Loeb, and T. J. Hope. 1998. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol* 72:5085-92.
- Elrefaei, M., B. Barugahare, F. Ssali, P. Mugenyi, and H. Cao. 2006. HIV-specific IL-10-positive CD8+ T cells are increased in advanced disease and are associated with decreased HIV-specific cytotoxicity. *J Immunol* 176:1274-80.
- Fambrough, D. M., K. Takeyasu, J. Lippincott-Schwarz, and N. R. Siegel. 1988. Structure of LEP100, a glycoprotein that shuttles between lysosomes and the plasma membrane, deduced from the nucleotide sequence of the encoding cDNA. *J Cell Biol* 106:61-7.
- Farza, H., M. Hadchouel, J. Scotto, P. Tiollais, C. Babinet, and C. Pourcel. 1988. Replication and gene expression of hepatitis B virus in a transgenic mouse that contains the complete viral genome. *J Virol* 62:4144-52.
- Febbraio, M., and R. L. Silverstein. 1990. Identification and characterization of LAMP-1 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. *J Biol Chem* 265:18531-7.
- Ferrari, C., A. Penna, P. Sansoni, T. Giuberti, T. M. Neri, F. V. Chisari, and F. Fiaccadori. 1986. Selective sensitization of peripheral blood T lymphocytes to hepatitis B core antigen in patients with chronic active hepatitis type B. *Clin Exp Immunol* 66:497-506.
- Ferrari, C., A. Penna, A. Bertoletti, A. Valli, A. D. Antoni, T. Giuberti, A. Cavalli, M. A. Petit, and F. Fiaccadori. 1990. Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 145:3442-9.
- Ferrari, C., A. Bertoletti, A. Penna, A. Cavalli, A. Valli, G. Missale, M. Pilli, P. Fowler, T. Giuberti, F. V. Chisari, and et al. 1991. Identification of immunodominant T cell epitopes of the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Clin Invest* 88:214-22.

- Finkelman, F. D., J. Holmes, I. M. Katona, J. F. Urban, Jr., M. P. Beckmann, L. S. Park, K. A. Schooley, R. L. Coffman, T. R. Mosmann, and W. E. Paul. 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol* 8:303-33.
- Fourel, G., C. Treppe, L. Bougueleret, B. Henglein, A. Ponzetto, P. Tiollais, and M. A. Buendia. 1990. Frequent activation of N-myc genes by hepadnavirus insertion in woodchuck liver tumours. *Nature* 347:294-8.
- Franco, A., L. G. Guidotti, M. V. Hobbs, V. Pasquetto, and F. V. Chisari. 1997. Pathogenetic effector function of CD4-positive T helper 1 cells in hepatitis B virus transgenic mice. *J Immunol* 159:2001-8.
- Fruh, K., and Y. Yang. 1999. Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Curr Opin Immunol* 11:76-81.
- Fukuda, M. 1991. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem* 266:21327-30.
- Galibert, F., T. N. Chen, and E. Mandart. 1982. Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: comparison with the hepatitis B virus sequence. *J Virol* 41:51-65.
- Ganem, D. 1982. Persistent infection of humans with hepatitis B virus: mechanisms and consequences. *Rev Infect Dis* 4:1026-47.
- Ganem, D., and H. E. Varmus. 1987. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem* 56:651-93.
- Ganem, D., and Schneider, R. 2001. Hepadnaviridae. The viruses and their replication. In: *Field's Virology* (Philadelphia, Lipincott-Raven).
- Ganem, D., and A. M. Prince. 2004. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 350:1118-29.
- Garcia-Navarro, R., B. Blanco-Urgoiti, P. Berraondo, R. Sanchez de la Rosa, A. Vales, S. Hervas-Stubbs, J. J. Lasarte, F. Borrás, J. Ruiz, and J. Prieto. 2001. Protection against woodchuck hepatitis virus (WHV) infection by gene gun coimmunization with WHV core and interleukin-12. *J Virol* 75:9068-76.
- Gerlich, W. H., and W. S. Robinson. 1980. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 21:801-9.
- Gregory, S. H., and E. J. Wing. 1993. IFN-gamma inhibits the replication of *Listeria monocytogenes* in hepatocytes. *J Immunol* 151:1401-9.
- Griffiths, G. M. 1995. The cell biology of CTL killing. *Curr Opin Immunol* 7:343-8.
- Guidotti, L. G., K. Ando, M. V. Hobbs, T. Ishikawa, L. Runkel, R. D. Schreiber, and F. V. Chisari. 1994. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3764-8.
- Guidotti, L. G., B. Matzke, H. Schaller, and F. V. Chisari. 1995. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* 69:6158-69.
- Hahn, S., R. Gehri, and P. Erb. 1995. Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. *Immunol Rev* 146:57-79.

- Heermann, K. H., U. Goldmann, W. Schwartz, T. Seyffarth, H. Baumgarten, and W. H. Gerlich. 1984. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *J Virol* 52:396-402.
- Henkart, P. A., and M. V. Sitkovsky. 1994. Cytotoxic lymphocytes. Two ways to kill target cells. *Curr Biol* 4:923-5.
- Hervas-Stubbs, S., J. J. Lasarte, P. Sarobe, I. Vivas, L. Condreay, J. M. Cullen, J. Prieto, and F. Borrás-Cuesta. 2001. T-helper cell response to woodchuck hepatitis virus antigens after therapeutic vaccination of chronically-infected animals treated with lamivudine. *J Hepatol* 35:105-11.
- Hieber, A. D., and D. L. Christie. 1993. Characterization of glycoprotein II from bovine adrenal medullary chromaffin granules. Identification of components representing the secretory vesicle counterparts of the lysosomal-associated membrane glycoproteins (lamp-1 and lamp-2). *J Biol Chem* 268:11073-8.
- Himeno, M., Y. Noguchi, H. Sasaki, Y. Tanaka, K. Furuno, A. Kono, Y. Sakaki, and K. Kato. 1989. Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding 107 kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *FEBS Lett* 244:351-6.
- Howard, C. R. 1986. The biology of hepadnaviruses. *J Gen Virol* 67 (Pt 7):1215-35.
- Jakob, T., P. S. Walker, A. M. Krieg, M. C. Udey, and J. C. Vogel. 1998. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol* 161:3042-9.
- Janeway, C. A. 2001. Immunobiology. Travers, P.; Walport, M., Shlomchik, M. 5. Auflage. Garland.
- Jilbert, A. R. 2005. Recent Advances in the Duck Hepatitis B Virus Model. *Monographs in Virology Models of Viral Hepatitis*. 25:42-56.
- Jung, M. C., U. Spengler, W. Schraut, R. Hoffmann, R. Zachoval, J. Eisenburg, D. Eichenlaub, G. Riethmüller, G. Paumgartner, H. W. Ziegler-Heitbrock, and et al. 1991. Hepatitis B virus antigen-specific T-cell activation in patients with acute and chronic hepatitis B. *J Hepatol* 13:310-7.
- Jung, M. C., H. M. Diepolder, U. Spengler, E. A. Wierenga, R. Zachoval, R. M. Hoffmann, D. Eichenlaub, G. Frosner, H. Will, and G. R. Pape. 1995. Activation of a heterogeneous hepatitis B (HB) core and e antigen-specific CD4+ T-cell population during seroconversion to anti-HBe and anti-HBs in hepatitis B virus infection. *J Virol* 69:3358-68.
- Kern, F., I. P. Surel, C. Brock, B. Freistedt, H. Radtke, A. Scheffold, R. Blasczyk, P. Reinke, J. Schneider-Mergener, A. Radbruch, P. Walden, and H. D. Volk. 1998. T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nat Med* 4:975-8.

- Klinman, D. M., A. K. Yi, S. L. Beaucage, J. Conover, and A. M. Krieg. 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2879-83.
- Kundra, R., and S. Kornfeld. 1999. Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J Biol Chem* 274:31039-46.
- Lanford, R. E., D. Chavez, K. M. Brasky, R. B. Burns, 3rd, and R. Rico-Hesse. 1998. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5757-61.
- Li, D. H., J. E. Newbold, and J. M. Cullen. 1996. Natural populations of woodchuck hepatitis virus contain variant precore and core sequences including a premature stop codon in the epsilon motif. *Virology* 220:256-62.
- Li, X., S. Sambhara, C. X. Li, M. Ewasyshyn, M. Parrington, J. Caterini, O. James, G. Cates, R. P. Du, and M. Klein. 1998. Protection against respiratory syncytial virus infection by DNA immunization. *J Exp Med* 188:681-8.
- Lieberman, J., P. Shankar, N. Manjunath, and J. Andersson. 2001. Dressed to kill? A review of why antiviral CD8 T lymphocytes fail to prevent progressive immunodeficiency in HIV-1 infection. *Blood* 98:1667-77.
- Lu, M., G. Hilken, J. Kruppenbacher, T. Kemper, R. Schirmbeck, J. Reimann, and M. Roggendorf. 1999. Immunization of woodchucks with plasmids expressing woodchuck hepatitis virus (WHV) core antigen and surface antigen suppresses WHV infection. *J Virol* 73:281-9.
- Lu, M., and M. Roggendorf. 2001. Evaluation of new approaches to prophylactic and therapeutic vaccinations against hepatitis B viruses in the woodchuck model. *Intervirology* 44:124-31.
- Maini, M. K., C. Boni, G. S. Ogg, A. S. King, S. Reignat, C. K. Lee, J. R. Larrubia, G. J. Webster, A. J. McMichael, C. Ferrari, R. Williams, D. Vergani, and A. Bertolotti. 1999. Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+) T cells associated with the control of infection. *Gastroenterology* 117:1386-96.
- Marion, P. L., L. S. Oshiro, D. C. Regnery, G. H. Scullard, and W. S. Robinson. 1980. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:2941-5.
- Marion, P. L., M. J. Van Davelaar, S. S. Knight, F. H. Salazar, G. Garcia, H. Popper, and W. S. Robinson. 1986. Hepatocellular carcinoma in ground squirrels persistently infected with ground squirrel hepatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4543-6.
- Mason, W. S., G. Seal, and J. Summers. 1980. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* 36:829-36.

- Mattei, M. G., J. Matterson, J. W. Chen, M. A. Williams, and M. Fukuda. 1990. Two human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2, are encoded by genes localized to chromosome 13q34 and chromosome Xq24-25, respectively. *J Biol Chem* 265:7548-51.
- Menne, S., J. Maschke, T. K. Tolle, M. Lu, and M. Roggendorf. 1997. Characterization of T-cell response to woodchuck hepatitis virus core protein and protection of woodchucks from infection by immunization with peptides containing a T-cell epitope. *J Virol* 71:65-74.
- Menne, S., J. Maschke, M. Lu, H. Grosse-Wilde, and M. Roggendorf. 1998. T-Cell response to woodchuck hepatitis virus (WHV) antigens during acute self-limited WHV infection and convalescence and after viral challenge. *J Virol* 72:6083-91.
- Millard, P. J., M. P. Henkart, C. W. Reynolds, and P. A. Henkart. 1984. Purification and properties of cytoplasmic granules from cytotoxic rat LGL tumors. *J Immunol* 132:3197-204.
- Miller, R. H., S. Kaneko, C. T. Chung, R. Girones, and R. H. Purcell. 1989. Compact organization of the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 9:322-7.
- Miller, R. H., R. Girones, P. J. Cote, W. E. Hornbuckle, T. Chestnut, B. H. Baldwin, B. E. Korba, B. C. Tennant, J. L. Gerin, and R. H. Purcell. 1990. Evidence against a requisite role for defective virus in the establishment of persistent hepadnavirus infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9329-32.
- Missale, G., A. Redeker, J. Person, P. Fowler, S. Guilhot, H. J. Schlicht, C. Ferrari, and F. V. Chisari. 1993. HLA-A31- and HLA-Aw68-restricted cytotoxic T cell responses to a single hepatitis B virus nucleocapsid epitope during acute viral hepatitis. *J Exp Med* 177:751-62.
- Moriyama, T., S. Guilhot, K. Klopchin, B. Moss, C. A. Pinkert, R. D. Palmiter, R. L. Brinster, O. Kanagawa, and F. V. Chisari. 1990. Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Science* 248:361-4.
- Mosmann, T. R., and R. L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145-73.
- Nayersina, R., P. Fowler, S. Guilhot, G. Missale, A. Cerny, H. J. Schlicht, A. Vitiello, R. Chesnut, J. L. Person, A. G. Redeker, and F. V. Chisari. 1993. HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J Immunol* 150:4659-71.
- Neurath, A. R., N. Strick, S. B. Kent, W. Offensperger, S. Wahl, J. K. Christman, and G. Acs. 1985. Enzyme-linked immunoassay of pre-S gene-coded sequences in hepatitis B vaccines. *J Virol Methods* 12:185-92.
- O'Garra, A. 1998. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 8:275-83.

- Penna, A., F. V. Chisari, A. Bertoletti, G. Missale, P. Fowler, T. Giuberti, F. Fiaccadori, and C. Ferrari. 1991. Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Exp Med* 174:1565-70.
- Peters, P. J., J. Borst, V. Oorschot, M. Fukuda, O. Krahenbuhl, J. Tschopp, J. W. Slot, and H. J. Geuze. 1991. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* 173:1099-109.
- Podack, E. R., and P. J. Konigsberg. 1984. Cytolytic T cell granules. Isolation, structural, biochemical, and functional characterization. *J Exp Med* 160:695-710.
- Pollack, J. R., and D. Ganem. 1994. Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two distinct reactions: RNA packaging and DNA synthesis. *J Virol* 68:5579-87.
- Popper, H., J. W. Shih, J. L. Gerin, D. C. Wong, B. H. Hoyer, W. T. London, D. L. Sly, and R. H. Purcell. 1981. Woodchuck hepatitis and hepatocellular carcinoma: correlation of histologic with virologic observations. *Hepatology* 1:91-8.
- Porgador, A., K. R. Irvine, A. Iwasaki, B. H. Barber, N. P. Restifo, and R. N. Germain. 1998. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J Exp Med* 188:1075-82.
- Portnoy, D. A., R. D. Schreiber, P. Connelly, and L. G. Tilney. 1989. Gamma interferon limits access of *Listeria monocytogenes* to the macrophage cytoplasm. *J Exp Med* 170:2141-6.
- Price, D. A., P. Klenerman, B. L. Booth, R. E. Phillips, and A. K. Sewell. 1999. Cytotoxic T lymphocytes, chemokines and antiviral immunity. *Immunol Today* 20:212-6.
- Rehermann, B., P. Fowler, J. Sidney, J. Person, A. Redeker, M. Brown, B. Moss, A. Sette, and F. V. Chisari. 1995. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp Med* 181:1047-58.
- Rehermann, B., K. M. Chang, J. McHutchinson, R. Kokka, M. Houghton, C. M. Rice, and F. V. Chisari. 1996a. Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. *J Virol* 70:7092-102.
- Rehermann, B., D. Lau, J. H. Hoofnagle, and F. V. Chisari. 1996b. Cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Invest* 97:1655-65.
- Robinson, J., and S. G. Marsh. 2000. The IMGT/HLA sequence database. *Rev Immunogenet* 2:518-31.
- Robinson, W. S., and R. L. Greenman. 1974. DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J Virol* 13:1231-6.
- Robinson, W. S., and L. I. Lutwick. 1976. The virus of hepatitis, type B (first of two parts). *N Engl J Med* 295:1168-75.

- Roman, M., E. Martin-Orozco, J. S. Goodman, M. D. Nguyen, Y. Sato, A. Ronaghy, R. S. Kornbluth, D. D. Richman, D. A. Carson, and E. Raz. 1997. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med* 3:849-54.
- Rubio, V., T. B. Stuge, N. Singh, M. R. Betts, J. S. Weber, M. Roederer, and P. P. Lee. 2003. Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. *Nat Med* 9:1377-82.
- Ruiz, M., V. Giudicelli, C. Ginestoux, P. Stoehr, J. Robinson, J. Bodmer, S. G. Marsh, R. Bontrop, M. Lemaitre, G. Lefranc, D. Chaume, and M. P. Lefranc. 2000. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* 28:219-21.
- Schirmbeck, R., X. Zheng, M. Roggendorf, M. Geissler, F. V. Chisari, J. Reimann, and M. Lu. 2001. Targeting murine immune responses to selected T cell- or antibody-defined determinants of the hepatitis B surface antigen by plasmid DNA vaccines encoding chimeric antigen. *J Immunol* 166:1405-13.
- Seder, R. A., and W. E. Paul. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 12:635-73.
- Seeger, C., B. Baldwin, W. E. Hornbuckle, A. E. Yeager, B. C. Tennant, P. Cote, L. Ferrell, D. Ganem, and H. E. Varmus. 1991. Woodchuck hepatitis virus is a more efficient oncogenic agent than ground squirrel hepatitis virus in a common host. *J Virol* 65:1673-9.
- Sette, A. D., C. Oseroff, J. Sidney, J. Alexander, R. W. Chesnut, K. Kakimi, L. G. Guidotti, and F. V. Chisari. 2001. Overcoming T cell tolerance to the hepatitis B virus surface antigen in hepatitis B virus-transgenic mice. *J Immunol* 166:1389-97.
- Sprengel, R., E. F. Kaleta, and H. Will. 1988. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J Virol* 62:3832-9.
- Stacey, K. J., M. J. Sweet, and D. A. Hume. 1996. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol* 157:2116-22.
- Stevens, T. L., A. Bossie, V. M. Sanders, R. Fernandez-Botran, R. L. Coffman, T. R. Mosmann, and E. S. Vitetta. 1988. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 334:255-8.
- Summers, J., J. M. Smolec, and R. Snyder. 1978. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:4533-7.
- Suni, M. A., L. J. Picker, and V. C. Maino. 1998. Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. *J Immunol Methods* 212:89-98.
- Testut, P., C. A. Renard, O. Terradillos, L. Vitvitski-Trepo, F. Tekaiia, C. Degott, J. Blake, B. Boyer, and M. A. Buendia. 1996. A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J Virol* 70:4210-9.

- Thimme, R., S. Wieland, C. Steiger, J. Ghrayeb, K. A. Reimann, R. H. Purcell, and F. V. Chisari. 2003. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 77:68-76.
- Tiollais, P., C. Pourcel, and A. Dejean. 1985. The hepatitis B virus. *Nature* 317:489-95.
- Topham, D. J., R. A. Tripp, and P. C. Doherty. 1997. CD8+ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes. *J Immunol* 159:5197-200.
- Transy, C., G. Fourel, W. S. Robinson, P. Tiollais, P. L. Marion, and M. A. Buendia. 1992. Frequent amplification of c-myc in ground squirrel liver tumors associated with past or ongoing infection with a hepadnavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3874-8.
- Tuttleman, J. S., C. Pourcel, and J. Summers. 1986. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* 47:451-60.
- Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, S. E. Parker, G. H. Rhodes, P. L. Felgner, V. J. Dwarki, S. H. Gromkowski, R. R. Deck, C. M. DeWitt, A. Friedman, and et al. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259:1745-9.
- Uthayakumar, S., and B. L. Granger. 1995. Cell surface accumulation of overexpressed hamster lysosomal membrane glycoproteins. *Cell Mol Biol Res* 41:405-20.
- Uy, A., V. Bruss, W. H. Gerlich, H. G. Kochel, and R. Thomssen. 1986. Precore sequence of hepatitis B virus inducing e antigen and membrane association of the viral core protein. *Virology* 155:89-96.
- Vento, S., E. G. Rondanelli, S. Ranieri, C. J. O'Brien, R. Williams, and A. L. Eddleston. 1987. Prospective study of cellular immunity to hepatitis-B-virus antigens from the early incubation phase of acute hepatitis B. *Lancet* 2:119-22.
- Wagner, L., O. O. Yang, E. A. Garcia-Zepeda, Y. Ge, S. A. Kalams, B. D. Walker, M. S. Pasternack, and A. D. Luster. 1998. Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature* 391:908-11.
- Wang, Y., S. Menne, J. R. Jacob, B. C. Tennant, J. L. Gerin, and P. J. Cote. 2003. Role of type 1 versus type 2 immune responses in liver during the onset of chronic woodchuck hepatitis virus infection. *Hepatology* 37:771-80.
- Wang, Y., S. Menne, B. H. Baldwin, B. C. Tennant, J. L. Gerin, and P. J. Cote. 2004. Kinetics of viremia and acute liver injury in relation to outcome of neonatal woodchuck hepatitis virus infection. *J Med Virol* 72:406-15.
- Warren, K. S., J. L. Heeney, R. A. Swan, Heriyanto, and E. J. Verschoor. 1999. A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*). *J Virol* 73:7860-5.

- Webster, G. J., S. Reignat, M. K. Maini, S. A. Whalley, G. S. Ogg, A. King, D. Brown, P. L. Amlot, R. Williams, D. Vergani, G. M. Dusheiko, and A. Bertolotti. 2000. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 32:1117-24.
- Wei, Y., G. Fourel, A. Ponzetto, M. Silvestro, P. Tiollais, and M. A. Buendia. 1992. Hepadnavirus integration: mechanisms of activation of the N-myc2 retrotransposon in woodchuck liver tumors. *J Virol* 66:5265-76.
- Will, H., W. Reiser, T. Weimer, E. Pfaff, M. Buscher, R. Sprengel, R. Cattaneo, and H. Schaller. 1987. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol* 61:904-11.
- Yang, D. L., M. Lu, L. J. Hao, and M. Roggendorf. 2000. Molecular cloning and characterization of major histocompatibility complex class I cDNAs from woodchuck (*Marmota monax*). *Tissue Antigens* 55:548-57.
- Zelinsky, G., S. J. Robertson, S. Schimmer, R. J. Messer, K. J. Hasenkrug, and U. Dittmer. 2005. CD8+ T-cell dysfunction due to cytolytic granule deficiency in persistent Friend retrovirus infection. *J Virol* 79:10619-26.
- Zhou, J. H., S. Ferencik, V. Rebmann, D. L. Yang, M. Lu, M. Roggendorf, and H. Grosse-Wilde. 2003. Molecular genetic and biochemical analysis of woodchuck (*Marmota monax*) MHC class I polymorphism. *Tissue Antigens* 61:240-8.
- Zimmermann, S., O. Egeter, S. Hausmann, G. B. Lipford, M. Rocken, H. Wagner, and K. Heeg. 1998. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* 160:3627-30.

6. Anhang

6.1 Sequenzen

Proteinsequenzen der Antigene des Virusstammes WHV 8

WHcAg (188 Aminosäuren)

MDIDPYKEFG SSYQLLNFLP LDFFPDLNAL VDTATALYEE ELTGREHCSP
 HHTAIRQALV CWDELTKLIA WMSSNITSEQ VRTIIVNHVN DTWGLKVRQS
 LWFHLSCLTF GQHTVQEFLV SFGVWIRTPA PYRPPNAPIL STLPEHTVIR
 RRGGARASRS PRRRTPSPRR RRSQSPRRRR SQSPSANC

WHsAg (431 Aminosäuren)

MGNNIKVTFN PDKIAAWWPA VGTYYTTTYP QNQSVEFQPGI YQTTSLINPK
 NQQELDSVLI NRYKQIDWNT WQGFVDQKL PLVSRDPPLK PHINQSAQTF
 EIKPGPIIVP GIRDIPRGLV PPQTPTNRDQ GRKPTPPTPP LRDTHPHLTM
 KNQTFRLQGF VDGLRDLTTT ERYHNAYGDP FTTLSPPVPT VSTILSPPST
 TGDPALSPPEM SPSSLLGLLA GLQVVYFLWT KILTIAQNLD WWWTSLSFPG
 GIPECTGQNS QFQTCCKHLPT SCPPTCNGFR WMYLRRFIIY LLVLLLCLIF
 LLVLLDWKGL IPVCPLQPTT ETTVNCRQCT LSVQDTYTPP YCCCLKPTAG
 NCTCWPIPISS WALGNYLWEW ALARFSWNL LVPLLQWLGG ISLIAWFLLI
 WMIWFWGPAL LSILPPFIFI FVLFFLIWVY I

Tabellarische Auflistung der verwendeten Peptide

Tab. 6.1: Peptide des WHcAg

Aminosäuresequenzen des Proteins			Aminosäuresequenzen des Proteins		
Bezeichnung		Aminosäuresequenz	Bezeichnung		Aminosäuresequenz
1	c1-15	MDIDPYKEFGSSYQL	19	c91-105	DTWGLKVRQSLWFHL
2	c6-20	YKEFGSSYQLLNFLP	20	c96-110	KVRQSLWFHLSCLT
3	c11-25	SSYQLLNFLPLDFFP	21	c101-115	LWFHLSCLTFGQHTV
4	c16-30	LNFLPLDFFPDLNAL	22	c106-120	SCLTFGQHTVQEFLV
5	c21-35	LDFFPDLNALVDTAT	23	c111-125	GQHTVQEFLVSFGVW
6	c26-40	DLNALVDTATALYEE	24	c116-130	QEFLVSFGVWIRTPA
7	c31-45	VDTATALYEEELTGR	25	c121-135	SFGVWIRTPAPYRPP
8	c36-50	ALYEEELTGREHCSP	26	c126-140	IRTPAPYRPPNAPIL
9	c41-55	ELTGREHCSPHHTAI	27	c131-145	PYRPPNAPILSTLPE
10	c46-60	EHCSPHHTAIRQALV	28	c136-150	NAPILSTLPEHTVIR
11	c51-65	HHTAIRQALVCWDEL	29	c141-155	STLPEHTVIRRRGGA
12	c56-70	RQALVCWDELTKLIA	30	c146-160	HTVIRRRGGGARASRS
13	c61-75	CWDELTKLIAWMSSN	31	c151-165	RRGGGARASRSPRRRT
14	c66-80	TKLIAWMSSNITSEQ	32	c156-170	RASRSPRRRTPSPRR
15	c71-85	WMSSNITSEQVRTII	33	c161-175	PRRRTPSPRRRRSQS
16	c76-90	ITSEQVRTIIVNHVN	34	c166-180	PSPRRRRSQSPRRRR
17	c81-95	VRTIIVNHVNNTWGL	35	c171-185	RRSQSPRRRRSQSPS
18	c86-100	VNHVNNTWGLKVRQS	36	c176-188	PRRRRSQSPSANC

Tab. 6.2: Peptide des WHsAg

Bezeichnung Aminosäuresequenz			Bezeichnung Aminosäuresequenz		
1	s1-15	MGNNIKVTFNPDKIA	42	s215-229	LLGLLAGLQVVYFLW
2	s6-20	KVTFNPDKIAAWWPA	43	s220-234	AGLQVVYFLWTKILT
3	s11-25	PDKIAAWWPAVGTTY	44	s225-239	VYFLWTKILTIAQNL
4	s16-30	AWWPAVGTYTTP	45	s230-244	TKILTIAQNLDWWWT
5	s21-35	VGTYTTPQNQSV	46	s235-249	IAQNLDWWWTSLSFP
6	s26-40	TTTYPQNQSVFQPGI	47	s240-254	DWWWTSLSFPGGIPE
7	s31-45	QNQSVFQPGIYQTTS	48	s245-259	SLSFPGGIPECTGQN
8	s36-50	FQPGIYQTTSLINPK	49	s250-264	GGIPECTGQNSQFQT
9	s41-55	YQTTSLINPKNQQEL	50	s255-269	CTGQNSQFQCKHLP
10	s46-60	LINPKNQQELDSVLI	51	s260-274	SQFQCKHLPPTSCPP
11	s51-65	NQQELDSVLINRYKQ	52	s265-279	CKHLPPTSCPPCTNGF
12	s56-70	DSVLINRYKQIDWNT	53	s270-284	TSCPPCTNGFRWMYL
13	s61-75	NRYKQIDWNTWQGFP	54	s275-289	TCNGFRWMYLRRFII
14	s66-80	IDWNTWQGFPVDQKL	55	s280-294	RWMYLRRFIIYLLVL
15	s71-85	WQGFVPDQKLPLVSR	56	s285-299	RRFIIYLLVLLCLLI
16	s76-90	VDQKLPLVSRDPPLK	57	s290-304	YLLVLLCLIFLLVL
17	s81-95	PLVSRDPPLKPHINQ	58	s295-309	LLCLIFLLVLLDWKG
18	s86-100	DPPLKPHINQSAQTF	59	s300-314	FLLVLLDWKGLIPVC
19	s91-105	PHINQSAQTFEIKPG	60	s305-319	LDWKGLIPVCPLQPT
20	s96-110	SAQTFEIKPGPIIVP	61	s310-324	LIPVCPLQPTTETTV
21	s101-115	EIKPGPIIVPGIRDI	62	s315-329	PLQPTTETTVNCRQC
22	s106-120	PIIVPGIRDIPRGLV	63	s320-334	TETTVNCRQCTLSVQ
23	s111-125	GIRDIPRGLVPPQTP	64	s325-339	NCRQCTLSVQDITYTP
24	s116-130	PRGLVPPQTPTNRDQ	65	s330-344	TLVQDITYTPPYCCC
25	s121-135	PPQTPTNRDQGRKPT	66	s335-349	DITYTPPYCCCLKPTA
26	s126-140	TNRDQGRKPTPTTP	67	s340-354	PYCCCLKPTAGNCTC
27	s131-145	GRKPTPTPLRDTH	68	s345-359	LKPTAGNCTCWPIPS
28	s135-149	TPPTPLRDTHPHLT	69	s350-364	GNCTCWPIPSSWALG
29	s150-164	MKNQTFRLQGFDGL	70	s355-369	WPIPSSWALGNYLWE
30	s155-169	FRLQGFDGLRDLTT	71	s360-374	SWALGNYLWEWALAR
31	s160-174	FVDGLRDLTTTERYH	72	s365-379	NYLWEWALARFSWLN
32	s165-179	RDLTTTERYHNAYGD	73	s370-384	WALARFSWLNLLVPL
33	s170-184	TERYHNAYGDPFTTL	74	s375-389	FSWLNLLVPLLQWL
34	s175-189	NAYGDPFTTLSPVVP	75	s380-394	LLVPLLQWLGGISLI
35	s180-194	PFTTLSPVPTVSTI	76	s385-399	LQWLGGISLIAWFL
36	s185-199	SPVPTVSTILSPPS	77	s390-404	GISLIAWFLLIWMIW
37	s190-204	TVSTILSPSTTGDP	78	s395-409	AWFLLIWMIWFWGPA
38	s195-209	LSPPSTTGDPALSPE	79	s400-414	IWMIWFWGPALLSIL
39	s200-214	TTGDPALSPSPSS	80	s405-419	FWGPALLSILPPFIP
40	s205-219	ALSPSPSSLLGLL	81	s410-424	LLSILPPFIPIFVLF
41	s210-224	MSPSSLLGLLAGLQV	82	s415-431	PPFIPIFVLFLLIWWYI

Sequenz des Woodchuck-CD107a-DNA-Fragmentes

Der in dieser Arbeit klonierten Sequenz des Woodchuck-CD107a-DNA-Fragmentes wurde die GenBank-Zugangsnummer EF159727 zugewiesen.

```

TTCGCTGACC CTCACCTTTCA CAAGAAACAC AACACGTTAT CGGGTCCAGC TCATGAGTTT TATTTACAAC
ATGTCAGACA CATGGACTTT CCCCAACGCA AGTTCCAAGG AAGTCAAGAA TGTTTCATCT GTAAC TGACA
TCAAGGCCGA CATAGACAAG AAGTACAGGT GTGTCAGCAC CACCCAGGTC CACATGAGCA ATGTGACCAT
CACCTCAGC GATGCCACCA TCCAGGCCTA CCTGTCAAGC AGCAGCTTCA GCAAGGGAGA GTCACGCTGC
AAGCAGGACA AGCCTGAGCC TTCCCCAACT GCCCTGCCAC CTGCTCCACC CAGCCCTTCG CCTAGCCCTG
TGCCCGCTGA GAGCCCCTCC GTGTCCAGGT ACAACGTGAG TGGTGACAAC GGGACCTGCC TGCTGGCCAG
CATGGGGCTG CAGCTGAACG TCACTTACGC CCGGAGGGAC AACACGACGG TGACTAGTGT GCTGAACATC
AACCCAAACG AGACCACAGC CAGCGGGAAC TGCAGTTCCC TCCTAGTGAC CCTGGAGCTG CAGAGCAAGA
AGGGCATGGT CCTGGTCTTG TGGTTTGGA TGAATGCAAG CTCTAGCCGG TTTTTCCTAC AAGGGATCCA
GTTGAATGCA ACTTTTCCTG ACGCCAAAGA GCCCACCCTC AGAGCCACCA ACACCTCACT GAGAGCCCTA
CAGGCCACCG TCGGGCACTC CTACAAGTGC AACACTGAGG AGCACATCCG TGTCACCCAG GCCTTCTCCC
TCAACATCTT CAGAGTGTGG GTCCAGGCCT TCCAGGTGGA AGGCGACAGG TTTGGGTCTG TGGAAGAGTG
TCTGCTGGAT GGAACAACA TGCTGATCCC CATAGCTGTG GGGGGCGCCC TGGCCGGGCT CGTCCTCATC
GTCTCATTTG CCTACCTCAT CGGCAGGAAG AGGAGTCACG CTGGCTACCA GACAATTTAG CAGACTGGCA
GGTGTGCCGC AGACAGCAGA GGCAGGGGGT CTGTTCTCGT GTCCCCAAGC TTAGATTCTG GTGGAGTGGG
GCACACTTTC TGGCAAACCG TTTTCAAATC TGCTTTATCA AATGTGAAGT ACATCCTGCA ACATTTACTA
TGCACAAAAA GAGTAACTAT TGAAATGACG GTGTTAATTT TGCTAACTGG GTTAAATATT TTGCTAATG
GTTAAACGTT AATATTTACC AAAGTAGAAC TCTAAAGAGG CAAGAGTGCT TTGCTAATGT GGCACGGCTC
CACTTTGATT CGACTGTTAA GATTTGGTGT TGGTTTTTTC ATTCTTTGCT CAGATTTAAG CCTTACAAAG
GGAAGTCTCT GGTTTGAACA CTTGGGCCTG GTGCAGGGTG GCTGATGGTG AGACTGGCAT GCTTAGAAAA
TTAAACATAG TAGAGCCAGG AAAGTGTTAC CGTGAGGTA CCAAGGGTGA ACACCTGGAT GCTCAGGTTA
AGCTTTTTCA GGAGGGCTGG CCCGCATGTG GTGAGGCAGT GTCCAGGCTG GCGGTGACCC TCATTGTTCC
CATGTTTTGC CGCCAAGA

```

Alignments

Auf den folgenden Seiten sind Sequenzalignments angegeben.

Das erste Alignment vergleicht die von CD107a-Nukleotidsequenzen von Mensch (*Homo sapiens*), Maus (*Mus musculus*), Javaneraffe (*Macaca fascicularis*) und Murmeltier (*Marmota monax*). Die Sequenzen folgender GenBank-Zugangsnummern wurden verwendet: NM_005561 (*H.sapiens*), NM_010684 (*M.musculus*), AB169064 (*M.fascicularis*).

Für das zweite Alignment wurden die CD107a-Aminosäuresequenzen von Mensch, Maus und Murmeltier verglichen. Die potenzielle Transmembranregion ist gekennzeichnet.

Abschließend sind die α 1-Regionen von MHC I-Nukleotidsequenzen verschiedener Spezies einander gegenübergestellt. Für das Murmeltier wurden unterschiedliche Allele (Mamol A*xx) ausgewählt. Des Weiteren wurden zwei humane MHC I-Allele (HLA-A1 und -A2) sowie ein murines MHC I-Allel (H-2K) in die Liste aufgenommen.

Für alle Alignments gilt:



identische Position



Block ähnlicher Positionen



konservierte Position



fehlende Position

Alignment der CD107a-Nukleotidsequenzen (1/8)

		Section 1									
		(1)	1	10	20	30	40	50	60	70	83
CD107a Homo sapiens	(1)	-----TGCGGGGAGGCCGAGCCGCCGGCGGCTCGACGCGCGCGCTCTCGCGAGACCCGCG									
CD107a Macaca fascicularis	(1)	-----									
CD107a Marmota monax	(1)	-----									
CD107a Mus musculus	(1)	CGTGACCACATCACGTGCGGAACGGAGCCTCCCGAAAGAGTGAAGTAAAGTGGCGGTCACCGCGCTCTCGCGAGACCCGCG									
		Section 2									
		(84)	84	90	100	110	120	130	140	150	166
CD107a Homo sapiens	(54)	GGAACACGTGACGCCCGGGCGCGGCGCAAGCTCACGTGACAAAGCGCTGCCGGCCCGCGGTGTCCTCTCTCGTGCCGGCGTCGCAGT									
CD107a Macaca fascicularis	(1)	-----									
CD107a Marmota monax	(1)	-----									
CD107a Mus musculus	(84)	GCACACGTGACCGGCGGGCGCGGCGAATGCTCACGTGACAGCGCTGCCGGCCCGCGAGGTGTCCTCTCTCGTGCCGGCGTCGCAGC									
		Section 3									
		(167)	167	180	190	200	210	220	230	249	
CD107a Homo sapiens	(137)	GGCCGGGCCTCTTCCGTCGTTGGTAACGCCGCTGTCTCTAACGCCAGCCCTTGCGCGCCCGCGCCCGCCAGCCGCCCGGCA									
CD107a Macaca fascicularis	(1)	-----									
CD107a Marmota monax	(1)	-----									
CD107a Mus musculus	(166)	TGGCGGGGCCTCTCCAGTC-----G-TGGAAGCGCGCCCTCCGCGCCG-----GCCTCGCC									
		Section 4									
		(250)	250	260	270	280	290	300	310	320	332
CD107a Homo sapiens	(220)	GTCCGCGGCCCAACCGCCGCTCGCGCCCCGCTCCCCGCAACCGTACCGGCCCGCCTCGCGCCATGGCGGCCCGCCGAGCGCC									
CD107a Macaca fascicularis	(1)	-----ACGTGTACCGGCCCGCCTCGCGCCATGGCGGCCCGCCGAGCGCC									
CD107a Marmota monax	(1)	-----									
CD107a Mus musculus	(213)	GCCCGCG---CAACCGCCGTC---CT-----CCGCGCTCGGCTGGCTCGCGCCATGGCGGCCCGCCG---GCC									

Alignment der CD107a-Nukleotidsequenzen (2/8)

										Section 5
	(333)	333	340	350	360	370	380	390	400	415
CD107a Homo sapiens	(303)	CGGCGG	ATCCCCTGCTGCTGCT	AT	TGCTGT	TGCTGCTGCTCGGCCTCA	TGCATTGTGC	GTCAGCAGCAATGTTTATGGTGA	AAAAA	
CD107a Macaca fascicularis	(45)	CGGCGG	TCCCTGCTGCTGCT	G	-----	TGCTGCTGCTCGGCCTCACGCATTGTGC	A	TCAGCAGCAATGTTTAT	A	GTGA
CD107a Marmota monax	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CD107a Mus musculus	(273)	CGGCGGCC	GCTGCT	CTGC	-----	TGCTGCTG	GCA	GGCCT	TG	CA
										Section 6
	(416)	416	430	440	450	460	470	480		498
CD107a Homo sapiens	(386)	TGGCAACGGGACCGCGTGCATAATGGCCAAC	TTCTCTGCTGCCTTCTCAGTGA	ACTACGACACCAAGAGTGGCCCTAAGAACA						
CD107a Macaca fascicularis	(122)	TGGCAACGGGACCGC	T	TGCATAATGGCCAAC	TTCTCTGCTGCCTTCTCAGTGA	ACTACGACACCAAGAGTGGCCCTAAGAACA				
CD107a Marmota monax	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CD107a Mus musculus	(344)	---	CAA	TGG	C	AC	AA	CGTG	T	ATAATGGCCA
										Section 7
	(499)	499	510	520	530	540	550	560	570	581
CD107a Homo sapiens	(469)	TGACCTTTGACCTGCCATCAGATGCCA	C	AGT	G	GTGCTCAAC	C	GCAGCTCCTGTGG	A	AAAGAGAACACTTCTGACCCAGTCTC
CD107a Macaca fascicularis	(205)	TGACCTTTGACCTGCCATCAGATGCCAAAGTAGTGCTCAAC	A	GCAGCTCCTGTGG	C	AAAGAGAACACTTCTGACCCAGCCTC				
CD107a Marmota monax	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CD107a Mus musculus	(424)	TGA	A	C	ATT	TC	CCTGCCA	G	C	CTC
										Section 8
	(582)	582	590	600	610	620	630	640	650	664
CD107a Homo sapiens	(552)	GTGATTGCTTTTGGGAAGAGGACAT	A	CACT	C	ACT	CTCAAT	TTCAC	G	AGAAATG
CD107a Macaca fascicularis	(288)	GTGAT	C	GCTTTTGGGAAGAGGACA	GA	CACT	A	ACCCTCAAT	TTCAC	A
CD107a Marmota monax	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CD107a Mus musculus	(507)	ACA	ATT	A	CTTTTGGGAAGAGGA	T	ATT	T	ACTG	AC

Alignment der CD107a-Nukleotidsequenzen (3/8)

														Section 9																										
	(665)	665	670	680	690	700	710	720	730	747																														
CD107a Homo sapiens	(635)	TGTTTAT	AACTT	TGTCAG	ACACA	CACCTTTT	CCCCAAT	TGC	GAGCTC	CAAAGAA	AATCA	AAGACT	GTGGAA	TC	TATAA	AACT	-	GACATC																						
CD107a Macaca fascicularis	(371)	TGTTTAT	AACTT	TGTCAG	ACACA	CACCTTTT	CCCCAAT	TGC	AAGCTC	CAAAGAA	AATCA	AAGACT	GTGGAA	TC	TATAA	AACT	T	GACATC																						
CD107a Marmota monax	(61)	TATTTA	CAAC	ATGTCAG	ACACA	TGGAC	TTTCCCCAA	C	GCAAG	TTCCAA	GGAAG	TCAAGA	ATGTTT	CA	TC	TGTA	AACT	-	GACATC																					
CD107a Mus musculus	(590)	TACA	TATAA	CTTGT	CAGAT	CAATTT	TCCCCAAT	TGC	CA	T	CAGCAA	AGATC	TACAC	CA	TGGAT	TC	CA	AACT	-	GACATC																				
														Section 10																										
	(748)	748	760	770	780	790	800	810	820	830																														
CD107a Homo sapiens	(717)	AGGGC	AGAT	TATAG	ATAAA	AAAA	TACAG	ATGTGT	TAGTGGC	AC	CCAGGTC	CACATGA	ACAA	C	GTGACC	GT	AACG	CTC	C	AT	GATGC																			
CD107a Macaca fascicularis	(454)	AGGGC	AGAT	TATAG	ATAAA	AAAA	TACAG	ATGTGT	TAGTGGC	AC	CCAGGTC	CACATGA	ACAA	C	GTGACC	GT	CACG	CTC	CA	C	GATGC																			
CD107a Marmota monax	(143)	AAGGC	CGA	CATAG	ACAA	GAA	G	TACAG	GTGTGT	C	AGCAC	CCAGGTC	CACATGA	G	CAAT	GTGACC	AT	CAC	C	CTC	AG	C	GATGC																	
CD107a Mus musculus	(672)	AAGGC	AGA	CATCA	ACAA	AGC	A	TAC	C	GGTGTGT	C	AGTG	AT	A	TCCGGGTC	T	ACATGA	A	GAA	T	GTGACC	GT	TGT	G	CTC	C	G	G	GATGC											
														Section 11																										
	(831)	831	840	850	860	870	880	890	900	913																														
CD107a Homo sapiens	(800)	CAC	CATCCAGGC	G	TACCTTT	C	AA	CAGCAG	CTTCAGCAG	GGG	GAGAG	AC	CACG	CTGTG	AA	CA	AGA	CAGG	CCT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	TCCCCAA										
CD107a Macaca fascicularis	(537)	CAC	CATCCAGGC	G	TACCTTT	C	AA	CAGCAG	CTTCAGCAG	GGG	A	AGAG	AC	G	CGCTGTG	AA	CA	AGA	CAGG	CCT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	TCCCCAA										
CD107a Marmota monax	(226)	CAC	CATCCAGGC	C	TACCTG	T	C	AAG	CAGCAG	CTTCAGCAG	AGG	G	AGAG	T	CACG	CTGC	A	AG	CAGGA	CAAG	CCT	GAG	C	C	T	G	A	G	C	TCCCCAA										
CD107a Mus musculus	(755)	CAC	TATCCAGGC	C	TACCTG	T	C	GAG	TG	GCA	A	CTTCAGCAG	A	GG	A	AGAG	AC	CA	CTG	CAC	A	CA	GGA	TG	G	A	C	C	T	-	-	-	-	TCCCCAA						
														Section 12																										
	(914)	914	920	930	940	950	960	970	980	996																														
CD107a Homo sapiens	(877)	C	CAC	AGCGCC	C	CTGCG	CCACCCAGCCC	CTCG	CCCTCAC	C	CGTGCCC	A	-	-	-	AGAG	CCCC	CT	CTGT	GGA	CAAGTACAA	CGT	GAG	C																
CD107a Macaca fascicularis	(614)	C	CAC	AGCGCC	G	CTGCG	CCACCCAGCCC	CTCG	CCCTCAC	C	CGTGCCC	G	-	-	-	AGAG	CCCC	CT	CTGT	GGA	CAAGTACAA	CGT	GAG	C																
CD107a Marmota monax	(309)	CTG	C	CTGCC	A	CTGCT	CCACCCAGCCC	TT	CGCTAG	C	CTGTGCCC	G	CTG	AGAG	CCCC	CT	C	GTGT	C	CAAGTACAA	CGT	GAG	T																	
CD107a Mus musculus	(832)	C	CAC	-	-	-	-	-	-	-	-	TGGG	CCACCCAGCCC	CTC	ACC	AC	C	A	CTTGTGCCC	A	-	-	-	C	A	A	CCCC	A	C	TGT	A	T	C	CAAGTACAA	T	G	T	A	C	T

Alignment der CD107a-Nukleotidsequenzen (4/8)

																Section 13															
	(997)	997		1010		1020		1030		1040		1050		1060		1079															
CD107a Homo sapiens	(957)	GGC	AC	CAACGGG	ACCTGCCTGCTGGCC	AGC	ATGG	GGCTG	CAG	CTGAA	C	CTCAC	CTA	TGAGAGGA	AAGGACAACAC	GACGGGTGAC															
CD107a Macaca fascicularis	(694)	GGC	AC	CAACGGG	ACCTGCCTGCTGGCC	AGC	ATGG	GGCTG	TAG	CTGAA	T	CTCAC	CTA	TGAGAGGA	AAGGACAACAC	GACGGGTGAC															
CD107a Marmota monax	(392)	GGT	GA	CAACGGG	ACCTGCCTGCTGGCC	AGC	ATGG	GGCTG	CAG	CTGAA	CG	TCAC	T	TA	CGCCCGG	AGGACAACAC	GACGGGTGAC														
CD107a Mus musculus	(903)	GGT	AA	CAACGG	AACCTGCCTGCTGGCC	TCT	ATGG	CA	CTG	CA	A	CTGAA	T	ATCAC	CTA	CCTGA	AAAGGACAACA	A	GACGGGTGAC												
																Section 14															
	(1080)	1080		1090		1100		1110		1120		1130		1140		1150		1162													
CD107a Homo sapiens	(1040)	AAGG	CTTC	TCAACATCA	CCCC	CAAC	AA	AGAC	CTCGG	C	AG	CGGGAGCTG	CGG	C	GCC	CAC	CTGGTGAC	TCTGGAGCTG	CACAGCG												
CD107a Macaca fascicularis	(777)	AAGG	CTTC	TCAACATCA	CCCC	CAAC	AA	AGAC	CTTGG	C	AG	CGGGAGCTG	CGG	C	GCC	CAC	CTGGTGAC	TCTGGAGCTG	CACAGCG												
CD107a Marmota monax	(475)	TAG	TGTG	CTGAACATCA	CCCC	AAAC	GA	AGAC	CA	AG	CC	AG	CGGGA	A	CTGC	AG	TTCC	CTCTAGTGAC	CCTGGAGCTG	CAGAGCA											
CD107a Mus musculus	(986)	CAG	AGCGT	TCAACATCA	GCCC	AAAT	GA	CAC	AT	--	C	TAG	TGGGAG	T	TGC	GG	TAT	CAAC	TTGGTGAC	CCTGAAAGTG	GAGACA										
																Section 15															
	(1163)	1163		1170		1180		1190		1200		1210		1220		1230		1245													
CD107a Homo sapiens	(1123)	AGGGCA	CCA	CCGT	CCTG	CTCTT	C	CAGTT	C	GGGATGAATGC	AGT	TCTAGCC	GGT	TTTTTCCT	A	CAAGGAAT	CCAGTTGAAT	ACA													
CD107a Macaca fascicularis	(860)	AGGGCAGCA	CCGT	CCTG	CTCTT	C	CAGTT	C	GGGATGAATGC	AGT	TCTAGCC	GGT	TTTTTCCT	A	CAAGGAAT	CCAGTTGAAT	ACA														
CD107a Marmota monax	(558)	AGAAGG	GCA	TG	GTCTG	GCTCTT	GTG	TTT	TGGGATGAATGC	AG	C	TCTAGCC	GGT	TTTTTCCT	A	CAAGG	GAT	CCAGTTGAAT	GCA												
CD107a Mus musculus	(1066)	AG	--	AACA	GAG	CCTG	GAA	TTG	CAGTTT	TGGGATGAATGC	CAG	C	TCTAGCC	T	GGT	TTTTTCCT	G	CAAGG	AGT	GC	TTGAAT	ATG									
																Section 16															
	(1246)	1246		1260		1270		1280		1290		1300		1310		1328															
CD107a Homo sapiens	(1206)	AT	CTTCCTGAC	GCC	AGAGAC	CTTG	CC	TTTA	AA	AGCTG	CCAAC	G	CTCC	CTG	C	GAGCG	CTGCAGGCCAC	AGT	CGGCAAT	TCCTA											
CD107a Macaca fascicularis	(943)	ACT	CTTCCTGAC	GCC	AGAGAC	CTTG	CC	TTTA	AA	AGCTG	CCAAC	AG	CTCC	CTG	A	GAGCG	CTGCAGGCCAC	CGT	CGGCAAT	TCCTA											
CD107a Marmota monax	(641)	ACT	TTTCCTGAC	GCC	AAAGAG	CC	CA	CTT	C	AGAGC	CA	CCAAC	A	CTCA	CTG	A	GAGCG	CTA	CAGGCCAC	CGT	CGGCAAT	TCCTA									
CD107a Mus musculus	(1146)	ACT	CTTCCTGA	T	GCC	CT	AG	T	G	CC	CA	ATT	C	AG	CAT	CT	CCAAC	CAT	TCA	CTGA	AA	AGCT	CT	T	CAGGCCAC	TGT	G	GGAA	AA	CTCA	ATA

Alignment der CD107a-Nukleotidsequenzen (5/8)

		Section 17																																											
	(1329)	1329		1340		1350		1360		1370		1380		1390		1400		1411																											
CD107a Homo sapiens	(1289)	CAAGT	GCAAC	GC	G	GAGGA	GCAC	GTC	CGT	GTCAC	CGA	AGGC	CTT	TTCA	AGTCAA	TAT	A	TTCA	A	AGTG	TGG	TCC	AGGC	TTT	CA	AAGG																			
CD107a Macaca fascicularis	(1026)	CAAGT	GCAAC	GC	C	GAGGA	GCAC	GTC	CG	C	GTCAC	CGA	AGGC	CTT	TTTC	AGTCAA	CAT	A	TTCA	A	AGTG	TGG	TCC	AGGC	TTT	CA	AAGG																		
CD107a Marmota monax	(724)	CAAGT	GCAAC	A	CT	GAGGA	GCAC	ATC	CGT	GTCAC	CC	AGGC	CTT	CTC	C	TCAA	CAT	C	TTCA	G	AGTG	TGG	TCC	AGGC	CTT	C	AAGG																		
CD107a Mus musculus	(1229)	CAAGT	GCAAC	A	CT	GAGGA	A	CAC	ATC	TTT	GTCA	GC	AAG	AT	GC	T	CTC	C	TCAA	T	GT	C	TTCA	G	TG	CA	GGTCC	AGGC	TTT	CA	AAGG														
		Section 18																																											
	(1412)	1412		1420		1430		1440		1450		1460		1470		1480		1494																											
CD107a Homo sapiens	(1372)	TGGA	AGGT	TG	GC	CA	GTTT	TGG	C	TCT	GTTGA	AG	GAGT	G	T	CT	GGA	C	GA	GAACA	G	CAT	G	CT	GAT	CCCC	AT	CG	CT	G	TGG	T	GCC												
CD107a Macaca fascicularis	(1109)	TGGA	AGGT	TG	GC	CA	GTTT	TGG	C	TCT	GTTGA	AG	GAGT	G	T	CT	GGA	C	GA	GAACA	A	CAT	G	CT	GAT	CCCC	AT	CG	CT	G	TGG	T	GCC												
CD107a Marmota monax	(807)	TGGA	AGGT	TG	GC	CA	GTTT	TGG	G	TCT	GTTGA	A	GAGT	G	T	CT	GGA	T	GG	GAACA	A	CAT	G	CT	GAT	CCCC	AT	A	G	CT	G	TGG	T	GCC											
CD107a Mus musculus	(1312)	TGGA	CA	GT	GA	CA	G	GTTT	TGG	G	TCT	GTTGA	A	GAGT	G	T	CT	AGGA	T	GG	T	AAACA	A	CAT	G	T	GA	T	CC	AT	G	CT	G	TGG	T	GCC									
		Section 19																																											
	(1495)	1495		1500		1510		1520		1530		1540		1550		1560		1577																											
CD107a Homo sapiens	(1455)	CTGGC	GGGG	CT	G	TCCT	CAT	CGT	CCT	CAT	C	GCCT	ACCT	C	G	T	CTGGC	AGGA	AGAG	GAGT	CAC	GC	A	GGCTA	CC	CAGAC	T	AT	CT	AGC	C														
CD107a Macaca fascicularis	(1192)	CTGGC	GGGG	CT	G	TCCT	CAT	CGT	CCT	CAT	C	GCCT	ACCT	C	G	T	CTGGC	AGGA	AGAG	GAGT	CAC	GC	C	GGCTA	CC	CAGAC	G	AT	CT	AGC	C														
CD107a Marmota monax	(890)	CTGGC	C	GGGG	CT	C	GTCCT	CAT	CGT	CCT	CAT	T	GCCT	ACCT	C	A	T	CTGGC	AGGA	AGAG	GAGT	CAC	GC	T	GGCTA	CC	CAGAC	A	AT	T	AGC	A													
CD107a Mus musculus	(1395)	CTGGC	A	GGGG	CT	G	TCCT	CAT	CGT	CCT	CAT	T	GCCT	ACCT	C	A	T	CTGGC	AGGA	AGAG	GAGT	CAC	GC	C	GGCTA	T	CAGAC	C	AT	CT	AGC	C													
		Section 20																																											
	(1578)	1578		1590		1600		1610		1620		1630		1640		1650		1660																											
CD107a Homo sapiens	(1538)	TGGT	-	G	CACGC	AG	GC	-	-	-	-	AC	AGC	AG	CT	GCA	-	-	GGGG	CT	C	T	G	T	TC	CTT	TC	T	CTGG	GCTTAG	GG	TC	C	TGT	C	GA	AG	GGGA	GGC						
CD107a Macaca fascicularis	(1275)	CG	-	-	G	CAAGC	AG	GC	-	-	-	-	AC	AGC	AG	CT	GCA	-	-	GGGG	CT	C	T	G	T	TC	CTT	TC	C	CTGG	GCTTAG	GG	TC	C	TGT	C	GA	AG	GGGA	GGC					
CD107a Marmota monax	(973)	GAC	T	G	G	CA	GGT	GT	GC	C	G	CAG	AC	AGC	AG	AG	GCA	G	-	GGGG	T	CT	G	T	T	C	T	G	T	CC	CAA	G	CTTAG	A	T	TC	G	TGT	G	GAG	T	GG	-	-	GGC
CD107a Mus musculus	(1478)	TGGT	-	G	GC	AG	GT	GC	-	-	-	-	AC	CAG	AG	A	T	GCA	CA	GGGG	CT	G	T	T	C	TC	ACA	T	CC	CAA	G	CTTAG	A	T	AG	G	TGT	G	GA	AG	GG	-	-	AGGC	

Alignment der CD107a-Nukleotidsequenzen (6/8)

										Section 21
(1661)	1661	1670	1680	1690	1700	1710	1720	1730	1743	
CD107a Homo sapiens (1613)	ACACTTTCTGGCAAAC	GTTC	TCAAATCTGCTT	CATC	CAATGTGAAGT	TATC	TGCA	GCATTTACTATGCACAA	CA	-GAGTA
CD107a Macaca fascicularis (1348)	ACACTTTCTGGCAAAC	GTTC	TCAAATCTGCTT	CATC	CAATGTGAAGT	TATC	TGCA	GCATTTACTATGCACAA	CA	-GAGTA
CD107a Marmota monax (1053)	ACACTTTCTGGCAAAC	CGTTT	TCAAATCTGCTT	TATC	AAATGTGAAGT	AATC	CTGCA	ACATTTACTATGCACAA	AA	AAGTA
CD107a Mus musculus (1554)	ACACTTTCTGGCAAAC	TGTTT	TAAATCTGCTT	TATC	AAATGTGAAGT	TATC	TGCA	ACATTTACTATGCACAA	AG	-GATA
										Section 22
(1744)	1744	1750	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1826	
CD107a Homo sapiens (1695)	ACTAT	C	GAAATGACGGTGT	TAAATTTTGCTAACTGGGT	TAAATATTTTGCTAACTGGGT	TAAAC	CA	TTAATAT	-	TTACCAAAGTAG
CD107a Macaca fascicularis (1430)	ACTAT	T	GAAATGACGGTGT	TAAATTTTGCTAACTGGGT	TAAATATTTTGCTAACTGGGT	TAAAC	CA	TTAATAT	-	TTACCAAAGTAG
CD107a Marmota monax (1136)	ACTAT	T	GAAATGACGGTGT	TAAATTTTGCTAACTGGGT	TAAATATTTTGCTAACTGGGT	TAAAC	CG	TTAATAT	-	TTACCAAAGTAG
CD107a Mus musculus (1636)	ACTAT	T	GAAATGACGGTGT	TAAATTTTGCTAACTGGGT	TAAATATTTTGCTAACTGGGT	TAAAC	TG	TTAATAT	G	TTACCAAAGTAG
										Section 23
(1827)	1827	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1909		
CD107a Homo sapiens (1777)	GATTT	TGAGGGTG	GGGGTGCT	CTCTG	AGGGGGTGGGGT	GCCGCTGTCTCTGAGGGGTGGGG	G	TGCCGCTGTCTCTGAGGG		
CD107a Macaca fascicularis (1512)	AAC	TCTGAGGGTG	GGAGTGC	-T	-	-	-	G	-	-
CD107a Marmota monax (1218)	AAC	TCTAAAGAG	G	-	-	-	-	-	-	-
CD107a Mus musculus (1719)	AG	TCTAAAGAG	G	-	-	-	-	-	A	-
										Section 24
(1910)	1910	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1992	
CD107a Homo sapiens (1860)	GTGGGGGTGCCG	CTCTCTCTGAG	GGGGTG	GGG	GTGCCGCTTTCTCTGAGGGGGTGGGG	TGCCGCTCTCTCTGAGGG	GGTGGG			
CD107a Macaca fascicularis (1534)	-	CTCTCTC	GAG	-	GGAG	-	-	-	-	GGTGGG
CD107a Marmota monax (1233)	-	-	A	GAG	-	-	-	-	-	-
CD107a Mus musculus (1733)	-	-	T	GAG	-	-	-	-	-	-

Alignement der CD107a-Nukleotidsequenzen (7/8)

										Section 25
	(1993)	1993	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2075
CD107a Homo sapiens (1943)	G	GTGCTGCTCT	CTCCG	AGGGGTGG	AAT	GCCGCTGTCTCTGAGGGGTGGGGG	TGCCGCT	CTAAATT	GGCTCCA	-TATCATTTGA
CD107a Macaca fascicularis (1555)	A	GTGCTGCTCT	-----	A-----	AAT-----	-----	TGGCACT	-----	GGCTCCA	CTATCATTTGA
CD107a Marmota monax (1237)	-----	TGCTTT	-----	-----	-----	-----	GCTAATGTGGC	AC	GGCTCCA	CTTTGATTGA
CD107a Mus musculus (1737)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	AA	GGCTCCA	--CTGATTGA
										Section 26
	(2076)	2076	2090	2100	2110	2120	2130	2140		2158
CD107a Homo sapiens (2025)	G	TTT	AGGTT	CTGGTGTTTGGTT	CTTCATTCTTT	ACTGCA	CTCAGATTTAAGCCTTACAAAGGGAA	AGC	CTCTGG	CCGTCAC
CD107a Macaca fascicularis (1595)	CTTT	AGGATT	CTGGTGTTTGGTT	CTTCATTCTTT	ACTGCA	CTCAGATTTAAGCCTTACAAAGGGAA	AGC	CTCCGG	CCGTCAC	
CD107a Marmota monax (1274)	CTGTT	AAGATT	TGGTGTT	-GGTTT	TTTCATTCTTT	-----	GCTCAGATTTAAGCCTTACAAAGGGAA	-GT	CTCTGG	TTTGAAC
CD107a Mus musculus (1755)	CTTT	TAA	AC	TGGTGTTTGGTT	-CTTCATTCTTT	-----	TCTCAGATTTAAGCCTTACAAAGGGAA	--T	CTCTGG	TCAGAC
										Section 27
	(2159)	2159	2170	2180	2190	2200	2210	2220	2230	2241
CD107a Homo sapiens (2108)	ACG	TAGGAC	GCATG	-AAGGTCA	CTCGT	GGTGAGGCTGACATGCT	CACACATTACAACA	--GTAGAG	A-GGGAAAATCCTAAGA	
CD107a Macaca fascicularis (1678)	ATG	TAGGAC	GCATG	-AAGGTCA	CTCGT	GGTGAGGCTGACATGCT	CACACATTACAACA	C--GTAGAG	A-GGGAAAATCCTAAGA	
CD107a Marmota monax (1350)	ACT	TGGGC	CTGGTG	CAGGGTGG	CTGAT	GGTGAGACTG	GCACTAGAA	AATTAACA	TAGTAGAG	CAGGAAGGTGTACCG
CD107a Mus musculus (1831)	CCT	TGGGC	CTGG	CA-AGGGTGG	CTGAT	GGT	TAGGCTG-CA	CACTTA-AGA	AGCAAAC	G--G--GAGC-AGGGAAGGCTTGCAC
										Section 28
	(2242)	2242	2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310	2324
CD107a Homo sapiens (2187)	CAGAGGAAC	TCCAGAGAT	GAGTGTCTGGAGCG	CTTCAGTT	CAGCTTTAA	AGGC	CAGGACGGGC	----	CACACGTGG	CTGGCGG
CD107a Macaca fascicularis (1757)	CAGAGGAAC	TCCAGAGAT	GAGTGTCTGGAGC	CTTCAGTT	CAGCTTTAA	AGGC	CAGGACAGGC	TGTC	CACACGCGG	CTGGCGG
CD107a Marmota monax (1433)	TG	GAGTAC	--CAAGGGTGA	ACACCTGGA	-TGCT	CAGGTTAAGCTTTT	----	CAGGA-GGGCTG	---GCC	CGCATGTGGTGA
CD107a Mus musculus (1906)	CA	CAGGCAC	G	CACAGGGTCA	ACC	TCTGGA	-CACTTG	GGTTGG	GCTACCT	-GGCCTGGGGGCTGAACTCTG

Alignment der CD107a-Nukleotidsequenzen (8/8)

										Section 29
	(2325)	2325	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2407
CD107a Homo sapiens (2266)		CCTCGT	-TCCAGTGG	CGGCACGTCC	TTGGGCCTCTTC	TAATGCTCTGCAGC	TCGAAGGGCTGGC	ACTTTT	TAAATATA	AAAAATGG
CD107a Macaca fascicularis (1840)		CCTCGT	-TCCAGTGG	CGGCACGTCC	TTGGGCCTCTTC	TAATGCTCTGCAGC	TCGAAGGGCTGGC	ACTTTT	TAAATATA	AAAAATGG
CD107a Marmota monax (1505)		GGCA	GTGTCCAG	GCTGGGCGTGA	CCCTCATTTGTTCC	ATGTTTTCGCGC	CAAGAA	-----	-----	-----
CD107a Mus musculus (1985)		-----	TGGGTAC	ACACCC	CCCAATTTCT	GTGCTCTGCAC	CCGTGAGCTG	CACCTTTCC	TAAATAG	AAAAT--G
										Section 30
	(2408)	2408	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490
CD107a Homo sapiens (2348)		GTGTTATTTT	TATTT--	TTTTTTGTAAAGT	GATTTT	TGGTCTTCTGTT	GACATTCGGGGT	GATCCTGT	-TCTGCGCT	GTTGTAC
CD107a Macaca fascicularis (1921)		GTGTTATTTT	TATTT--	TTTTTTGTAAAGT	GATTTT	TGGTCTTCTGTT	GACATTCGGGGT	GATCCTGT	-TCTGCGCT	GTTGTAC
CD107a Marmota monax (1560)		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CD107a Mus musculus (2054)		GCA	TTATTTT	TATTTAC	TTTTTTGTAAAGT	GATTTT	CAGTCTTG	TGTTGG	CGTTCA	GGGTGGCCTGTCTCTGCACTGTGTAC
										Section 31
	(2491)	2491	2500	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2573
CD107a Homo sapiens (2428)		AATGTGAGAT	CGGTGC	TTCTCT	TGATGTTTTGCCG	TGGCTTGGGGATT	GTACACGGGAC	--	CAGCTCACGTAATGCATTGCC	
CD107a Macaca fascicularis (2001)		AATGTGAGAT	AGGTGC	TTCTCT	TGATGTTTC	GCCGCGGCTTGGGGATT	GTACACAGGAC	--	CAGCTCACGTAATGCATTGCC	
CD107a Marmota monax (1560)		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CD107a Mus musculus (2137)		AATAAT	AGATTCACA	C-TGCTGAC	G-TGTC	TTGCA	GCGTAG	-GTGGT	TGTACACTGGG	CATCAGCTCACGTAATGCATTGCC
										Section 32
	(2574)	2574	2580	2590	2600	2610	2626			
CD107a Homo sapiens (2509)		TGTAACAATG	-TAATAAAAAAGCCTCTTTCTTT	TAAAAA	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	A				
CD107a Macaca fascicularis (2081)		TGTAACAATG	-TAATAAAAAAGCCTCTTTCTTT	A	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	-				
CD107a Marmota monax (1560)		-----	-----	-----	-----	-----				
CD107a Mus musculus (2217)		TGTAAC	GATGC	TAATAAAAAAGTCTC	CTTTT	GTCTGTC	AAAAA	-----		

Alignmet der CD107a-Aminosäuresequenzen (1/1)

		Section 1																	
		1	10	20	30	40	50	60	70										
CD107a (Homo sapiens)	(1)	MAAPGS	ARRPL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	Section 1	84
CD107a (Marmota monax)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
CD107a (Mus musculus)	(1)	-----	MAAPG	ARRP	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	LLLL	Section 2	168
		(85)	85	90	100	110	120	130	140	150									
CD107a (Homo sapiens)	(85)	TS	DP	SL	V	I	A	F	G	R	G	H	T	L	T	L	N	Section 2	168
CD107a (Marmota monax)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
CD107a (Mus musculus)	(79)	V	SD	PS	L	T	I	T	F	G	R	G	Y	L	T	L	N	Section 3	252
		(169)	169	180	190	200	210	220	230	240									
CD107a (Homo sapiens)	(169)	T	L	H	D	A	T	I	Q	A	Y	L	S	N	S	S	F	Section 4	336
CD107a (Marmota monax)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
CD107a (Mus musculus)	(163)	V	L	R	D	A	T	I	Q	A	Y	L	S	G	N	F	S	Section 4	336
		(253)	253	260	270	280	290	300	310	320									
CD107a (Homo sapiens)	(253)	T	R	L	L	N	I	N	P	N	K	T	S	A	S	G	S	Section 4	336
CD107a (Marmota monax)	(1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
CD107a (Mus musculus)	(244)	T	R	A	F	N	I	S	P	N	-	D	T	S	S	G	S	Section 4	336

Section 5

	(337)	337	350	360	370	380	390	400	417	
CD107a (Homo sapiens)	KCN	A	E E H V R	V T K A F	S N I	F K V M V Q A F K V	E G Q	F G S V E E C L L D	N S M L I P I A V G G A L G L V L I V L I A Y L V	G R K R S H A G Y Q T I
CD107a (Marmota monax)	KCN	T	E E H I R	V T Q A F	S N I	F R V M V Q A F Q V	E G D R	F G S V E E C L L D	G N M M L I P I A V G G A L G L V L I V L I A Y L I	G R K R S H A G Y Q T I
CD107a (Mus musculus)	KCN	T	E E H I F	V S K M L	S I N V	F S V Q V Q A F K V	D S D R	F G S V E E C V Q D	C N M M L I P I A V G G A L G L V L I V I A Y L I	G R K R S H A G Y Q T I

Transmembranregion

Section 1

113

Section 2

114

	(185)	185	190	200	210	220	230	241		
21032 (181)	A	ACCTA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	GTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
22531-2 (181)	A	ACCTA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	GTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
22531-3 (181)	A	ACCTA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	GTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
22531-4 (181)	A	ACCTA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	GTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
30342-1 (181)		GACCTA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	CTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
22524 (181)		GACCTA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	GTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
Mamol A*07 (182)		GACCTA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	GTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
22531-1 (181)	A	ACCGA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	CTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
Mamol A*12 (182)		GACCGA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	CTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
Mamol A*19 (182)		GACCTA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	CTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
HLA-A2 (185)		GACTCA	CCGAGT	GAGCC	GGGG	AAC	CTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGAGGCGG	
HLA-A1 (185)		GACTGA	CCGAGT	GAGCC	GGGG	AAC	CTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGAGGACGG	
H-2K (185)		GTGGTT	CCGAGT	GAGCC	GAGG	AAC	GC	GCTACTAC	AACCAGAGCGAGAGCGG	
Mamol A*06 (182)		GACCTA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	CTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
30341 (181)		GACCTA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	CTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
30342-2 (181)		GACCTA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	CTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
Mamol A*15 (182)		GACCTA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	CTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
Mamol A*20 (182)		GACCTA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	CTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
Mamol A*08 (182)		GACCGA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	GTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
Mamol A*04 (182)		GTATT	TA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	CTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG
Mamol A*11 (182)		GACCTA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	CTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
Mamol A*13 (182)		GACCTA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	CTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
Mamol A*10 (182)		GACCTA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	CTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
Mamol A*09 (182)		GACCTA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	GC	GCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
Mamol A*17 (182)		GACCTA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	CTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
Mamol A*01 (182)		GACCTA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	CTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG	
Mamol A*02 (182)		GTATT	TA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	GTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG
Mamol A*03 (182)		GTATT	TA	CCGAGT	GAGCC	CAAC	AAC	GTGC	GCGGCTACTAC	AACCAGAGCGCGGGCGG

6.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1: Morphologie der Hepadnaviren
- Abb. 1.2: Genomorganisation des Hepatitis B-Virus
- Abb. 1.3: Der Replikationszyklus des Hepatitis B-Virus
- Abb. 1.4: Schematischer Verlauf einer Hepatitis B-Infektion
- Abb. 1.5: Die Strukturen eines MHC Klasse I- und eines MHC Klasse II-Moleküls
- Abb. 1.6: Der Granula-abhängige zytolytische Mechanismus von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL)
- Abb. 1.7: Struktur des CD107a-Proteins
- Abb. 2.1: Versuchsablauf der DNA-Immunisierungen
- Abb. 3.1: Schematische Darstellung der zur Stimulation verwendeten preS2/S-WHsAg-Peptide
- Abb. 3.2: Die IFN γ -Expression muriner T-Lymphozyten nach Stimulation mit den preS2/S-WHsAg-Peptidpools
- Abb. 3.3: Exemplarische Darstellung der IFN γ -Expression muriner CD4⁺ Zellen nach Stimulation mit preS2/S-WHsAg-Peptidpools
- Abb. 3.4: Exemplarische Darstellung der IFN γ -Expression muriner CD8⁺ Zellen nach Stimulation mit preS2/S-WHsAg-Peptidpools
- Abb. 3.5: Lokalisation des Peptidpools 12 des preS2/S-WHsAg
- Abb. 3.6: Die IFN γ -Expression muriner T-Lymphozyten nach Stimulation mit den Einzelpeptiden des preS2/S-WHsAg-Peptidpools 12
- Abb. 3.7: Exemplarische Darstellung der IFN γ -Expression muriner CD4⁺ Zellen nach Stimulation mit den Einzelpeptiden des preS2/S-WHsAg-Peptidpools 12
- Abb. 3.8: Schematische Darstellung der Lokalisation der verwendeten Primer
- Abb. 3.9: Exemplarische Darstellung der gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten einer Klonierungs-PCR der Woodchuck-CD107a-DNA-Sequenz
- Abb. 3.10: Schematische Darstellung der zur Stimulation verwendeten WHcAg-Peptide.
- Abb. 3.11: Exemplarische Darstellung der CD107a-Expression stimulierter Splenozyten eines Murmeltiers mit ausgeheilter WHV-Infektion.
- Abb. 3.12: Anteil CD107a-positiver T-Zellen an den eingegrenzten Zellen nach Peptidstimulation bei sechs Murmeltieren mit ausgeheilter WHV-Infektion
- Abb. 3.13: Exemplarische Darstellung der CD107a-Expression stimulierter Splenozyten eines naiven Murmeltiers
- Abb. 3.14: Exemplarische Darstellung der CD107a-Expression stimulierter Zellen aus dem Lymphknoten eines Murmeltiers mit ausgeheilter WHV-Infektion
- Abb. 3.15: Lokalisation des WHcAg-Peptidpools 4
- Abb. 3.16: Exemplarische Darstellung der CD107a-Expression von Splenozyten nach Stimulation mit den Einzelpeptiden des WHcAg-Peptidpools 4
- Abb. 3.17: Phänotypische Charakterisierung der WHV-spezifischen T-Lymphozyten
- Abb. 3.18: Verlauf der akuten WHV-Infektion von Murmeltier 22524
- Abb. 3.19: Darstellung der CD107a-Expression stimulierter PBMC von Murmeltier 22524 während der akuten WHV-Infektion
- Abb. 3.20: Verlauf der akuten WHV-Infektion von Murmeltier 22531
- Abb. 3.21: Darstellung der CD107a-Expression stimulierter PBMC von chronisch WHV-infizierten Murmeltieren
- Abb. 3.22: Schematische Darstellung der zur Stimulation verwendeten WHsAg-Peptide.
- Abb. 3.23: Verlauf der WHsAg-spezifischen T-Zellantwort in der akuten Phase einer WHV-Infektion
- Abb. 3.24: Schematische Darstellung der Woodchuck-MHC Klasse I-mRNA
- Abb. 3.25: Phylogenetischer Baum der α 1-Region von MHC Klasse I-Nukleotidsequenzen

6.3 Tabellenverzeichnis

- Tab.1.1: Hepadnaviren und ihre natürlichen Wirte
- Tab. 2.1: Genotyp der verwendeten Bakterienstämme
- Tab. 2.2: Absorptions- und Emissionsmaximum der Fluorochrome
- Tab. 2.3: Monoklonale Antikörper für Maus-Lymphozyten
- Tab. 2.4: Antikörper für Woodchuck-Lymphozyten
- Tab. 2.5: Sonstige Antikörper und Konjugate
- Tab. 2.6: Oligonukleotide
- Tab. 2.7: Antikörper für die intrazelluläre Zytokinfärbung
- Tab. 2.8: Antikörper für den Woodchuck-CD107a-Degranulationstest
- Tab. 2.9: Reagenzien für die cDNA-Synthese
- Tab. 2.10: Reaktionsansatz für die MHC Klasse I-PCR
- Tab. 2.11: PCR-Bedingungen für die MHC Klasse I-PCR
- Tab. 2.12: Reaktionsansatz für die Woodchuck-CD107a-Klonierungs-PCR
- Tab. 2.13: PCR-Bedingungen für die Woodchuck-CD107a-Klonierungs-PCR
- Tab. 2.14: Reaktionsansatz für die RT-PCR
- Tab. 2.15: Reaktionsbedingungen für die RT-PCR
- Tab. 3.1: Lokalisation der zur Klonierung verwendeten Primer sowie die in einer PCR zu erwartende Fragmentgröße unterschiedlicher Primerkombinationen in Bezug auf die humane CD107a-Sequenz (2560 nt)
- Tab. 6.1: Peptide des WHcAg
- Tab. 6.2: Peptide des WHsAg

6.4 Publikationsverzeichnis

Publikationen

Acute resolving Woodchuck Hepatitis Virus infection is associated with a strong CTL response to a single WHV core peptide. I. Frank, C. Budde, M. Fiedler, U. Dahmen, S. Viazov, M. Lu, U. Dittmer, M. Roggendorf. *Journal of Virology*, *im Druck*.

Vorträge

Evaluation of CD107a (LAMP-1) as a marker for cytotoxic T-lymphocyte activity in the woodchuck system. I. Frank, C. Budde, U. Dahmen, M. Lu, M. Roggendorf. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie. München, 2006.

A novel strategy for determining WHV-specific CTL responses in woodchucks by CD107a degranulation assay. I. Frank, C. Budde, U. Dahmen, M. Lu, M. Roggendorf. International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Vancouver/Canada, 2006.

Poster

Identification of murine T cell epitopes in the Woodchuck Hepatitis Virus surface antigen (WHsAg). I. Frank, M. Lu, M. Roggendorf. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie. München, 2006.

Crossreactivity of commercial human antibodies to woodchuck cell surface markers. I. Frank, M. Lu, M. Roggendorf. International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Vancouver/Canada, 2006.

6.5 Danksagung

Ich danke . . .

... meinem Doktorvater Prof. Dr. med. M. Roggendorf für die Vergabe des Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit. Auch durch sein Engagement für das Graduiertenkolleg hat er maßgeblich zum Erfolg der Promotion beigetragen.

... allen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Virologie, die durch vielfältige Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

... der Chirurgin Dr. med. Uta Dahmen mit Mitarbeitern für ihre Hilfe bei den Milzbiopsien.

... der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung der Arbeit in Form des Graduiertenkollegs „Modulation von Wirtszellfunktionen bei chronischen Infektionen“.

... ganz besonders meiner Familie, auf deren Hilfe und Unterstützung ich mich jederzeit verlassen konnte.

6.6 Lebenslauf

Ina Schulte geb. Frank
geboren am 26. Mai 1979 in Bad Friedrichshall
Diplom-Biochemikerin

- seit 06/ 2004 Doktorarbeit
„Charakterisierung der zellulären Immunantwort nach
Infektion mit dem Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) in
nordamerikanischen Walddarmtieren“
am Institut für Virologie des Universitätsklinikums Essen
als Stipendiatin des Graduiertenkollegs
„Modulation von Wirtszellfunktionen bei chronischen
Infektionen“
- 01/2003 – 12/2003 Diplomarbeit
„Charakterisierung von Donorzelllinien mit unterschiedlichen
Derivatchromosomen 4 auf ihre Vermittlung von
Telomerasesuppression in HPV-positiven Zelllinien“
in der Arbeitsgruppe „Gynäkologische Molekularbiologie“
an der Universitätsfrauenklinik Jena
mit der Note „sehr gut“
- 10/1998 – 12/2003 Diplomstudiengang Biochemie / Molekularbiologie,
Friedrich-Schiller-Universität (FSU) in Jena
- 09/1989 – 06/1998 Allgemeine Hochschulreife,
Auguste-Pattberg-Gymnasium, Mosbach-Neckarelz
mit der Note 1,4

Essen, den 06.06.2007

Ina Schulte

6.7 Erklärungen zur Dissertation

Erklärungen gemäß § 6, Abs. 2, Nr. 6-8, Promotionsordnung der Fachbereiche 6-9 der Universität Duisburg-Essen

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Charakterisierung der zellulären Immunantwort nach Infektion mit dem Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) in nordamerikanischen Waldmurmeltieren“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Ina Schulte befürworte.

Essen, den 06.06.2007

Prof. Dr. med. M. Roggendorf

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 06.06.2007

Ina Schulte

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 06.06.2007

Ina Schulte